

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BERNARDO BONILAURI

EXPRESSÃO DE RNAS NÃO-CODIFICANTES LONGOS NO INÍCIO DA
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DE TECIDO
ADIPOSO

CURITIBA

2018

BERNARDO BONILAURI

EXPRESSÃO DE RNAS NÃO-CODIFICANTES LONGOS NO INÍCIO DA
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DE TECIDO
ADIPOSO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Bonilauri, Bernardo

Expressão de RNA's não-codificantes longos no início da diferenciação de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo. / Bernardo Bonilauri.

– Curitiba, 2018.

192 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Bruno Dallagiovanna Muñiz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Células-tronco. 2. Tecido adiposo. 3. RNA Longo não Codificante. 4. Polirribossomos. I. Título. II. Muñiz, Bruno



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **BERNARDO BONILAURI** intitulada: **Expressão de RNA's não-codificantes longos no início da diferenciação de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2018.


BRUNO DALLAGIOVANNA MUNIZ
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LYSANGELA RONALTE ALVES
Avaliador Externo (ICC)


DANIELA FIORI GRADIA
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esse trabalho a Deus, a minha amada esposa
Thaylah e à meus pais e irmã; por todo o amor, apoio e
cuidado com a minha vida. Hoje e sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois seu amor e graça à minha humanidade imperfeita são uma dádiva. Além do mais, jamais estaria onde estou sem a Sua intervenção. Meu amor supremo e eterno, acima de todas as coisas, tens.

Gratidão a minha amada esposa Thaylah, por compartilhar da vida comigo e por simplesmente me amar como eu sou. Certamente és uma maravilhosa esposa e mulher. Sempre me fará querer ser alguém melhor, te amo muito.

A meus pais, por simplesmente serem exemplos de caráter e amor. Obrigado por todo o cuidado e preocupação durante minha vida. Tenham certeza que sou eternamente grato a vocês e espero sempre poder honra-los. Amo vocês.

Aos meus avós Diniz e Rosalina, por terem tido imensa influência em minha vida e por todo o carinho. Com certeza, cruciais na minha formação como cidadão.

Agradeço ao meu orientador Dr. Bruno Dallagiovanna pela imensa oportunidade de vivenciar a ciência e fazer parte do laboratório. Uma honra certamente. Sou grato por seu comprometimento e por sua capacidade de conseguir extrair o melhor das pessoas.

Meus sinceros agradecimentos a todos os integrantes do Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco (LABCET). Alguns já não estão mais conosco, outros permanecem; com cada um tive a oportunidade de aprender algo, seja no âmbito profissional, seja no pessoal. Muito obrigado por me aturarem e suportarem alguns níveis altíssimos de chatices e reflexões históricas e filosóficas.

Meu muito obrigado a todos os funcionários do Instituto Carlos Chagas (ICC-Fiocruz), sejam relacionados a parte técnica, manutenção, administrativa ou de pesquisa. Assim como, meu agradecimento as plataformas de Citometria de Fluxo, Microscopia e Proteômica do ICC. Apesar de pouco estar fisicamente no setor de Ciências Biológicas da UFPR, agradeço pelas aulas e conhecimento difundido que foram e são tão importantes para a minha formação. Também, foi um prazer fazer parte do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos colaboradores do departamento de bioinformática do Instituto Pasteur de Montevideo, no Uruguai. Em especial à Dra. Lucía Spangenberg.

Às agências de fomento que são de grande importância para o desenvolvimento de novas pesquisas, meus agradecimentos a CAPES, CNPq, Fundação Araucária e Fiocruz.

“O primeiro gole do copo das ciências naturais pode até torná-lo ateu. Mas, no fundo do mesmo copo, Deus o aguarda.”

Werner Heisenberg (1901-1976)

“Porque na muita sabedoria há muito enfado; e quem aumenta ciência aumenta tristeza”

Eclesiastes 1.18

RESUMO

RNAs não codificantes longos (*lncRNAs*) possuem um importante papel na regulação transcricional e pós-transcricional. São classificados como transcritos maiores que 200 nucleotídeos, que não apresentam potencial de codificar proteínas, sendo observados tanto no núcleo como no citoplasma. Novos estudos tem demonstrado a grande importância destes RNAs na diferenciação celular, porém pouco se compreende a cerca de sua dinâmica e de seus mecanismos de ação, principalmente nos processos de diferenciação de células-tronco adultas. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil de expressão dos *lncRNAs* logo no disparo inicial da diferenciação, além de sua associação aos polissomos em células-tronco adultas. Utilizamos sequenciamento em larga escala (RNA-Seq) dos RNAs associados aos polissomos e da fração total, obtidos através da técnica de *Polysome Profile* de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo submetidas a 24h de diferenciação osteogênica e adipogênica. Com isso, verificamos a expressão diferencial de 46 *lncRNAs* na fração total e 73 *lncRNAs* na fração polissomal após a indução osteogênica e 76 *lncRNAs* na fração total e 89 *lncRNAs* na fração polissomal após a indução adipogênica. Todos estes *lncRNAs* foram classificados e caracterizados de acordo com suas localizações genômicas, comprimento, número de éxons, conteúdo GC, estrutura e potencial codificante. Curiosamente, ao compararmos os *lncRNAs* com expressão diferencial nas frações total e polissomal, notamos que há poucos transcritos comuns entre elas, o que nos indica possíveis funções distintas entre os RNAs das frações. Além disso, ao compararmos as duas diferenciações, poucos *lncRNAs* comuns entre elas foram visualizados da mesma forma, demonstrando assim, que logo no início da diferenciação (24h) há uma clara distinção da regulação transcricional e pós-transcricional de *lncRNAs* durante a adipogênese e osteogênese. Alguns *lncRNAs* polissomais relacionados ao processo de diferenciação foram selecionados para a validação do RNA-seq, sendo demonstrados sua expressão durante todo o processo de diferenciação osteogênica (21 dias) e adipogênica (14 dias), além de comprovarmos a associação destes *lncRNAs* aos polissomos através da técnica de *Polysome Profiling* com adição do inibidor da tradução puromicina. Podemos concluir que, a expressão de *lncRNAs* durante o disparo inicial da diferenciação celular se mostrou bastante específica, inclusive em relação aos *lncRNAs* associados aos polissomos, denotando uma ampla regulação transcricional e pós transcricional logo no primeiro dia das diferenciações osteogênica e adipogênica.

Palavras-chave: *lncRNAs*; polissomo, diferenciação, células-tronco, pós-transcricional e transcricional.

ABSTRACT

Long non-coding RNAs (lncRNAs) play an important role in transcriptional and posttranscriptional regulation. They are classified as transcripts greater than 200 nucleotides, which don't possible to encode proteins, being observed either in the nucleus and cytoplasm. New studies demonstrated a great importance of these RNAs in cell differentiation, though there is no complete understanding of their dynamics and mechanisms of action, especially during adult stem cell differentiation. The objective of this work was to study the expression profile of lncRNAs at the initial step of differentiation, and also its association with polysomes in adult stem cells. We used the large-scale sequencing (RNA-Seq) of both, total fraction and the RNAs associated with the polysomes, obtained from adipose tissue-derived adult stem cells previously submitted to 24h of adipogenic and osteogenic differentiation through the *Polysome Profiling*. Accordingly, we verified the differential expression of 46 lncRNAs in the total fraction and 73 lncRNAs in the polysomal fraction after osteogenic induction. After the adipogenic induction we found 76 lncRNAs in the total fraction and 89 lncRNAs in the polysomal fraction. These lncRNAs were classified and characterized according to their locations, size, number of exons, GC content, structure and coding potential. Interestingly, when comparing differential expressed lncRNAs in total and polysomal fractions, we noticed that there are only few common transcripts between them, which indicates different functions and regulation for the lncRNAs which were exclusive to each fractions. In addition, when comparing the two differentiations, few common lncRNAs were visualized between the two processes demonstrating that in early steps of differentiation (24h) there is a clear distinction between the transcriptional and posttranscriptional regulation of lncRNAs. Some polysomal lncRNAs envolved in differentiation process were selected for the validation of RNA-Seq. For this, lncRNAs expression was demonstrated during the whole process of osteogenic (21 days) and adipogenic (14 days) differentiation. Besides, we proved the association of these lncRNAs with the polysomes through *Polysome Profiling* technique with addition of the puromycin. We can conclude that; the expression of lncRNAs during the initial steps of cell differentiation was quite specific, including the lncRNAs associated with polysome, denoting a wide transcriptional and posttranscriptional regulation right after the first day of osteogenic and adipogenic differentiations.

Keywords: lncRNAs; polysome; differentiation; stem cells; posttranscriptional and transcriptional.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® - Marca registrada

bp – *base pairs*

cDNA – DNA complementar

Content – Conteúdo

CPM – *Counts per Million*

DAPI - 4'6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloreto

DEG – Differentialy Express Genes

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – Deoxyribonucleic Acid

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos trifosfatos

Down-regulado – Regulação reduzida

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ENCODE – Encyclopedia of DNA Elements Consortium

FDR – *False Discovery Rate*

g – Aceleração de gravidade

hADSC – human Adipose-derived Stem Cells

hASC – human Adult Stem Cells

hMSC – human Mesenchymal Stromal-Stem Cells

IBMX – 3-isobutil 1-metilxantina

ICC – Instituto Carlos Chagas

Length – Comprimento

lincRNA – long intergenic noncoding RNA

lncRNA – *long noncoding RNA*

Log2FC – *Log2 Fold-Change*

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mRNA – *messenger RNA*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

Non-Coding – Gene não codificador de proteína

nt – Nucleotídeos

ORF – *Open Reading Frame*

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

Protein-Coding – Gene Codificador de proteína

qPCR – PCR quantitativa

RNA – *Ribonucleic Acid*

RPKM – *Reads Per Kilobase Per Million*

RT – *Reverse Transcription*

SFB – Soro Fetal Bovino

sncRNA – *small noncoding RNA*

sORF – *small ORF*

TBE – Tris-borato-EDTA

Tris-HCl – Trisaminometano e ácido clorídrico

Up-regulado – Regulação aumentada (superexpressão)

UTR – *mRNA untranslated region*

µg - Micrograma

µm – Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 – RNAs não codificantes	16
1.2 – Funções e mecanismos dos lncRNAs	18
1.2.1 – Regulação da cromatina.....	18
1.2.2. – Regulação transcricional e pós-transcricional.....	19
1.3 – lncRNAs associados a ribossomos e polissomos	22
1.4 – Células-tronco Adultas	25
1.4.1 – Adipogênese	27
1.4.2 Osteogênese	29
1.5 – lncRNAs e diferenciação de MSCs.....	31
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 – Modelo de estudo e aspectos éticos.....	37
3.2. - Cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo	37
3.3 – Diferenciação adipogênica e osteogênica	38
3.3.1 – Marcação através do método Vermelho Nilo (Adipogênese)	38
3.3.2 – Marcação através do Kit OsteolImage™ (Osteogênese).....	39
3.4 – Separação de RNA por gradiente de sacarose e purificação (<i>Polysome Profiling</i>) ..	39
3.5 – Construção da biblioteca de cDNA e RNA-Seq	40
3.6 – Análise dos dados	40
3.7 – Análises <i>in silico</i>	41
3.8 – Extração de RNA Total.....	43
3.9 – Síntese de cDNA pela transcriptase reversa	43
3.10 – Análise de expressão qualitativa (RT-PCR).....	44
3.11 – Eletroforese em gel de agarose.....	46
3.12 – Associação de lncRNAs aos polissomos	46
4 RESULTADOS	48
4.1 – Cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano.....	48
4.2 – Perfil polissomal das células-tronco adultas	49
4.3 – Sequenciamento de nova geração em larga escala (RNA-Seq)	50
4.4 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAs NÃO CODIFICANTES LONGOS NO INÍCIO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR	52
4.4.1 – Osteogênese	52
4.4.2 – Expressão diferencial de lncRNAs no início da osteogênese (24h)	54

4.4.3 – Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração Total	56
4.4.4 – Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração Polissomal ..	60
4.4.5 – Comparação entre as frações no início da osteogênese	63
4.5 – Adipogênese	69
4.5.1 – Expressão diferencial de lncRNAs no início da adipogênese (24h)	70
4.5.2 – Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração Total	72
4.5.3 – Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração Polissomal ..	75
4.5.4 – Comparação entre as frações no início da adipogênese	77
4.6 – Comparação entre os lncRNAs diferencialmente expressos na adipogênese e osteogênese	82
4.7 – lncRNAs Antisentido.....	85
4.8 – Expressão de lncRNAs diferencialmente expressos.....	93
4.9 – Interação lncRNAs-Ribossomos.....	102
4.10 – Potencial codificador de proteínas.....	105
5 – Peptidômica	111
6 CONCLUSÕES.....	116
7 REFERÊNCIAS	118
8 APÊNDICE.....	142
APÊNDICE 1 – Caracterização das células-tronco derivadas de tecido adiposo por citometria de fluxo.	142
APÊNDICE 2.1 – Triplicata biológica da diferenciação osteogênica.....	143
APÊNDICE 2.2 – Triplicata biológica da diferenciação adipogênica.....	144
APÊNDICE 3 – Correlação entre tamanho e número de exons de todas as frações.....	145
APÊNDICE 4.1 – Elementos transponíveis dos lncRNAs e mRNA polissomais.	146
APÊNDICE 4.2 - Significância através do teste estatístico Kolmogorov-Smirnov para elementos transponíveis.	147
APÊNDICE 5.1 – lncRNAs antisense e seus respectivos genes codificadores de proteína da fita contrária expressos na fração total (Osteogênese).....	142
APÊNDICE 5.2 – lncRNAs antisense e seus respectivos genes codificadores de proteína da fita contrária expressos na fração polissomal (Osteogênese).....	143
APÊNDICE 5.3 – lncRNAs antisense e seus respectivos genes codificadores de proteína da fita contrária expressos na fração total (Adipogênese)	144
APÊNDICE 5.4 – lncRNAs antisense e seus respectivos genes codificadores de proteína da fita contrária expressos na fração polissomal (Adipogênese)	145
APÊNDICE 6.1 – 29 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL após 24h de indução osteogênica.	147

APÊNDICE 6.2 – 17 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL após 24h de indução osteogênica.....	149
APÊNDICE 7.1 – 49 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.	150
APÊNDICE 7.2 – 24 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.	152
APÊNDICE 8.1 – 15 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados somente na fração TOTAL após 24h de indução osteogênica.....	153
APÊNDICE 8.2 – 10 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados somente na fração TOTAL após 24h de indução osteogênica.....	154
APÊNDICE 8.3 – 35 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados somente na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.	155
APÊNDICE 8.4 – 17 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados somente na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.	157
APÊNDICE 8.5 – 14 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados comuns nas frações TOTAL e POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.	158
APÊNDICE 8.6 – 7 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados comuns nas frações TOTAL e POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.	159
APÊNDICE 9.1 – 57 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL após 24h de indução adipogênica.....	160
APÊNDICE 9.2 – 19 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL após 24h de indução adipogênica.....	163
APÊNDICE 10.1 – 46 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL após 24h de indução adipogênica.	164
APÊNDICE 10.2 – 43 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL após 24h de indução adipogênica.	166
APÊNDICE 11.1 – 35 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados somente na fração TOTAL após 24h de indução adipogênica.....	168
APÊNDICE 11.2 – 3 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados somente na fração TOTAL após 24h de indução adipogênica.....	170
APÊNDICE 11.3 – 24 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados somente na fração POLISSOMAL após 24h de indução adipogênica.	171
APÊNDICE 11.4 – 27 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados somente na fração POLISSOMAL após 24h de indução adipogênica.	172
APÊNDICE 11.5 – 22 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados comuns nas frações TOTAL e POLISSOMA após 24h de indução adipogênica.	174

APÊNDICE 11.6 – 16 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados comuns nas frações TOTAL e POLISSOMA após 24h de indução adipogênica.	175
APÊNDICE 12.1 – 18 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL somente na diferenciação osteogênica (24h).	176
APÊNDICE 12.2 – lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL somente na diferenciação osteogênica (24h).	177
APÊNDICE 12.3 – 46 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL somente na diferenciação adipogênica (24h).	179
APÊNDICE 12.4 – 31 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL somente na diferenciação adipogênica (24h).	181
APÊNDICE 12.5 – 11 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL na diferenciação osteogênica e adipogênica (24h).	183
APÊNDICE 12.6 – 14 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL na diferenciação osteogênica e adipogênica (24h).	184
APÊNDICE 13.1 – 10 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL somente na diferenciação osteogênica (24h).	185
APÊNDICE 13.2 – 18 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL somente na diferenciação osteogênica (24h).	186
APÊNDICE 13.3 – 12 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL somente na diferenciação adipogênica (24h).	187
APÊNDICE 13.4 – 37 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL somente na diferenciação adipogênica (24h).	188
APÊNDICE 13.5 – 7 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL na diferenciação osteogênica e adipogênica (24h).	190
APÊNDICE 13.6 – 6 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL na diferenciação osteogênica e adipogênica (24h).	191
APÊNDICE 14 – Fragmentos de proteínas reconhecidos na peptidômica por espectrometria de massas	192

1 INTRODUÇÃO

1.1 – RNAs não codificantes

Atualmente, estima-se que aproximadamente 80%-90% do genoma humano seja transcrito ao menos uma vez durante o desenvolvimento. No entanto, o genoma humano é composto por menos de 3% de genes codificadores de proteínas, o restante, é constituído de uma enorme fração de sequências intergênicas e intrônicas não codificantes (BIRNEY et al. 2007; MERCER et al. 2011; HANGAUER, VAUGHN & MCMANUS, 2013). A transcrição dessa fração não codificante, antigamente conhecida como DNA lixo (COMINGS, 1972; ORGEL & CRICK, 1980), foi considerada um ruído do processo transcricional de genes codificantes por quase 20 anos. Com o advento das tecnologias de sequenciamento massivo, conhecidas como RNA-Seq; além de métodos computacionais, permitiu-se a construção dos transcritos e suas isoformas expressas, em uma resolução nunca vista anteriormente. Estes estudos iniciais, identificaram milhares de genes não codificantes em diversos tipos celulares e tecidos. Além disso, revelaram diversas propriedades globais desses RNAs como; o padrão de expressão tecido-específico, identificação da localização em alguns *locus* conservados, identificação de ortólogos entre humanos e camundongos e diversas propriedades regulatórias (TRAPNELL et al. 2009; CABILI et al. 2011; RINN & CHANG 2012).

Convencionalmente, os RNAs não codificantes (ncRNAs) são classificados por não apresentarem potencial de codificar proteínas e em função de seu tamanho. Por exemplo, os ncRNAs pequenos, possuem tamanhos inferiores a 200 nucleotídeos, sendo inclusos nessa categoria, os microRNAs (miRNAs; 19-20 nt), os RNAs nucleares pequenos (*small nuclear RNAs* – snRNAs; <150 nt), RNAs *piwi-interacting* (piRNAs; 24-31 nt), RNAs transportadores (tRNA; 76-90 nt), entre outros. Os transcritos maiores que 200 nucleotídeos são classificados como ncRNAs longos (lncRNAs) e pseudogenes (KUNG, COLOGNORI & LEE 2013). Muitos lncRNAs possuem propriedades similares aos mRNAs, sendo transcritos pela RNA polimerase II, possuindo Cap 5' e sendo poliadenilados (VAN HEESCH

et al. 2014). No entanto, em contraste com genes codificadores de proteínas, os lncRNAs contêm poucos íntrons, são expressos em baixos níveis e demonstram limitada conservação filogenética (CABILI et al. 2011).

Estes RNAs, são também, comumente caracterizados em relação a sua localização genômica, sendo classificados como intergênicos (lincRNAs – *long intergenic noncoding RNAs*), os quais são transcritos de regiões intergênicas entre genes codificadores; lncRNAs antisentido (*antisense*), que se sobrepõem a um gene codificador na fita contrária; lncRNAs *sense overlapping*, são genes que se sobrepõem a um éxon de outro gene codificador de proteínas na mesma fita; lncRNAs intrônicos (*sense intronic*), os quais se encontram em um íntron de um gene codificador; TEC (*to be experimentally confirmed*), transcritos que necessitam de validação experimental; *miscellaneous* (misc_RNA), transcritos ainda não classificados em outras categorias e transcritos processados (*Processed transcript*), os quais, teoricamente, não contêm ORFs (*Open Reading Frame*) (Figura 1.1) (DERRIEN et al. 2012; MA, BAJIC & ZHANG 2013; LAURENT, WAHLESTEDT & KAPRANOV 2015).

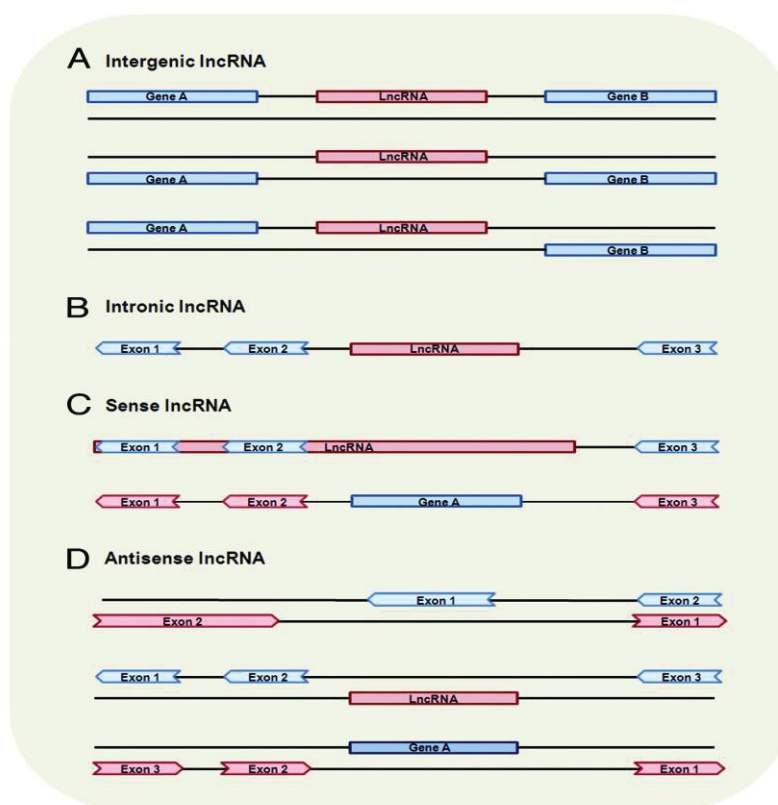


FIGURA 1.1: Contexto e classificação quanto a localização genômica dos lncRNAs. (A) RNAs intergênicos (*lincRNAs*), (B) lncRNAs *Sense_intronic* (C) *Sense_overlapping* e (D) lncRNAs

antisense. Os transcritos classificados como TEC, misc_RNA e processed_transcript não foram classificados em nenhuma dessas categorias até o momento. Genes codificadores estão representados em azul e lncRNAs em vermelho. Adaptado de (MA et al. 2013).

Curiosamente, os primeiros estudos a verificarem os papéis regulatórios dos lncRNAs remonta a era pré-genoma humano, no início dos anos de 1990, com a descoberta do H19, um lncRNA de origem materna que sofre *imprinting* genômico (BRANNAN et al. 1990); do lncRNA Xist, o qual tem como função o silenciamento epigenético do cromossomo X (BROCKDORFF et al. 1992; BROWN et al. 1992) e do lncRNA TERC, um dos componentes do complexo enzimático da telomerase, o qual tem função crucial na manutenção do tamanho do telômeros (FENG et al. 1995). Desde então, o número crescente de pesquisas relacionadas aos lncRNAs demonstram que estes transcritos podem ser considerados uma das maiores classes de reguladores transcricionais e pós-transcricionais da célula. No entanto, pouco se compreende acerca dos mecanismos de ação destes RNAs, além de que, muitos lncRNAs possuem mais que uma função regulatória.

1.2 – Funções e mecanismos dos lncRNAs

Até o momento, aproximadamente 101.000 genes humanos codificam lncRNAs, gerando assim, mais de 167.000 transcritos (ZHAO et al. 2016). Suas funcionalidades e possíveis modos de ação estão longe de serem elucidados, no entanto, alguns trabalhos demonstram um vasto repertório de mecanismos de regulação celular, estando envolvidos na regulação do desenvolvimento e diferenciação celular, manutenção do estado de pluripotência, comprimento dos telômeros, metástase, reparo à danos no DNA, inativação do cromossomo X, splicing, estrutura celular (MELÉ & RINN 2016; BELTRAN et al. 2008; GINGER et al. 2006; TRIPATHI et al. 2010; KUNG, COLOGNORI & LEE 2013), entre outros.

1.2.1 – Regulação da cromatina

Uma das funções dos lncRNA está relacionada ao controle epigenético da expressão gênica, através de ativação ou repressão. Estes RNAs possuem a

capacidade de recrutar proteínas de regulação da cromatina, de forma *cis*, regulando os genes próximos a sua localidade, ou de forma *trans*, regulando genes localizados em outros pontos do DNA ou outros cromossomos (Figura 1.2). Estudos de sequenciamento em larga escala e de interação RNA-Proteína demonstraram que os complexos modificadores de cromatina, por exemplo as proteínas Polycomb (PRC2) humanas, interagem com um grande número de lncRNAs e são recrutadas por estes, exercendo assim, suas funções no local requerido (KHALIL et al. 2009). Por exemplo, o lncRNA HOTAIR, agindo em *trans*, reprime a transcrição de HOXD através da interação com PRC2, no entanto o mecanismo de *trans*-ativação/repressão não foi elucidado (RINN et al. 2007). Já o lncRNA HOTTIP, age em *cis*, interagindo com o complexo de metiltransferases MLL1, o qual induz a trimetilação H3K4 de HOXA, promovendo sua transcrição (WANG et al. 2011). Além disso, outros complexos epigenéticos possuem interação com lncRNA, sendo que; em alguns casos, os lncRNAs podem servir como arcabouços onde algumas proteínas podem se associar e assim coordenar modificações da cromatina de múltiplas formas (PANDEY et al. 2008). Além do mais, o lncRNA ecCEBPA, um lncRNA enriquecido exclusivamente no núcleo e não poliadenilado, se liga diretamente à proteína DNMT1 (uma metiltransferase), o que previne a metilação do gene codificador CEBPA (DI RUSCIO et al. 2013). Contudo, sugere-se ainda, que o simples processo de transcrição dos lncRNAs poderia ser funcional para o controle epigenético, sendo que esta transcrição, induziria uma estrutura aberta da cromatina nos promotores de genes codificadores de proteínas, facilitando o acesso da RNA Polimerase II (MERCER et al. 2009).

1.2.2. – Regulação transcricional e pós-transcricional

Os lncRNAs podem também, agir como cofatores transcricionais que regulam a atividade de fatores de transcrição. Por exemplo, o lncRNA Evf2 pode recrutar o fator de transcrição DLX2, induzindo a expressão do gene próximo Dlx6 (BERGHOF et al. 2013). Já o lncRNA DHFR, forma uma estrutura tripla DNA-RNA com o promotor do gene codificador de proteína DHFR e assim, inibe o complexo de pré-iniciação da transcrição de ser montado (MARTIANOV et al. 2007). O lncRNA PANDA, age como “isca” para o fator de transcrição NF-YA, sequestrando-

o para longe de seus genes alvos (HUNG et al. 2011). Alguns lncRNAs contendo sequências Alu, possuem a capacidade de se ligarem à RNA polimerase II e impedir com que ela estabeleça contato com o promotor durante a formação do complexo de pré-iniciação (YAKOVCHUK, GOODRICH & KUGEL 2009). Os lncRNAs podem influenciar diretamente na estabilidade e no processamento de mRNAs. Por exemplo, o lncRNA GOMAFU/MIAT, dificulta a formação do spliceossomo e afeta o *splicing* de determinados mRNAs, através do sequestro de SF1 (*splicing factor 1*) (TSUIJI et al. 2011). Outros lncRNAs, como por exemplo o MALAT1, também influenciam no processamento de transcritos alternativos (TRIPATHI et al. 2010).

Além disso, esses RNAs podem influenciar a localização de fatores de transcrição (FT) na célula, por exemplo, o lncRNA NRON previne o direcionamento do FT NFAT para o núcleo, possivelmente através da interação com proteínas da família das importinas (WILLINGHAM et al. 2005). NRON pode sequestrar o FT para complexos de ribonucleoproteínas citoplasmáticas que contêm quinases, causando assim a desfosforilação de NFAT (SHARMA et al. 2011). Outra forma de regulação, também citoplasmática, se dá através da interação entre lncRNAs e proteínas de ligação a RNA (RBP – *RNA Binding Proteins*). O lncRNA TINCR recruta a RBP Staufén1, formando assim um complexo TINCR/Staufén1 que se liga a mRNAs relacionados a diferenciação epidermal, promovendo a estabilização desses transcritos durante o estágio final de diferenciação (KRETZ et al. 2013). Outro lncRNA citoplasmático, NORAD, possui elementos repetitivos em sua sequência, os quais contêm sítios de ligação funcionais com as RBPs Pumilio (PUM). Através da ligação NORAD/PUM, ocorre a regulação dos níveis de mRNAs alvos de PUM (TICHON et al. 2016).

Curiosamente, muitos lncRNAs codificam também pequenos RNAs (sRNAs), por exemplo, o lncRNA H19 codifica o miR-675 (KENIRY et al. 2012); os RNAs Gtl2, anti-Rtl1 e Mirg codificam aproximadamente 50 microRNAs (miRNAs) e 40 RNAs nucleolares pequenos (DA ROCHA et al. 2008) e o GAS5 codifica 10 RNAs nucleolares pequenos altamente conservados (SMITH & STEITZ 1998). A ligação entre lncRNAs e microRNAs vai além. Um novo mecanismo proposto, denominado RNAs de competição endógena (*ceRNA – competing endogenous RNAs*), denota uma interação RNA-RNA entre lncRNAs e microRNAs, visto que muitos lncRNAs e pseudogenes possuem sítios de ligação a miRNAs em suas regiões 3'UTR, esta

interação serviria para impedir a função de ligação de miRNAs em seus mRNAs alvos, liberando-os para sua tradução (FRANCO-ZORRILA et al. 2007; SALMENA et al. 2011) (Figura 1.2).

O estudo dos lncRNAs, suas funções e mecanismos é altamente complexo, visto a ampla capacidade regulatória desses transcritos e por estes RNAs possuírem mais de uma função. Com isso, futuros trabalhos tenderão a esclarecer novos processos regulatórios em diversas funções biológicas.

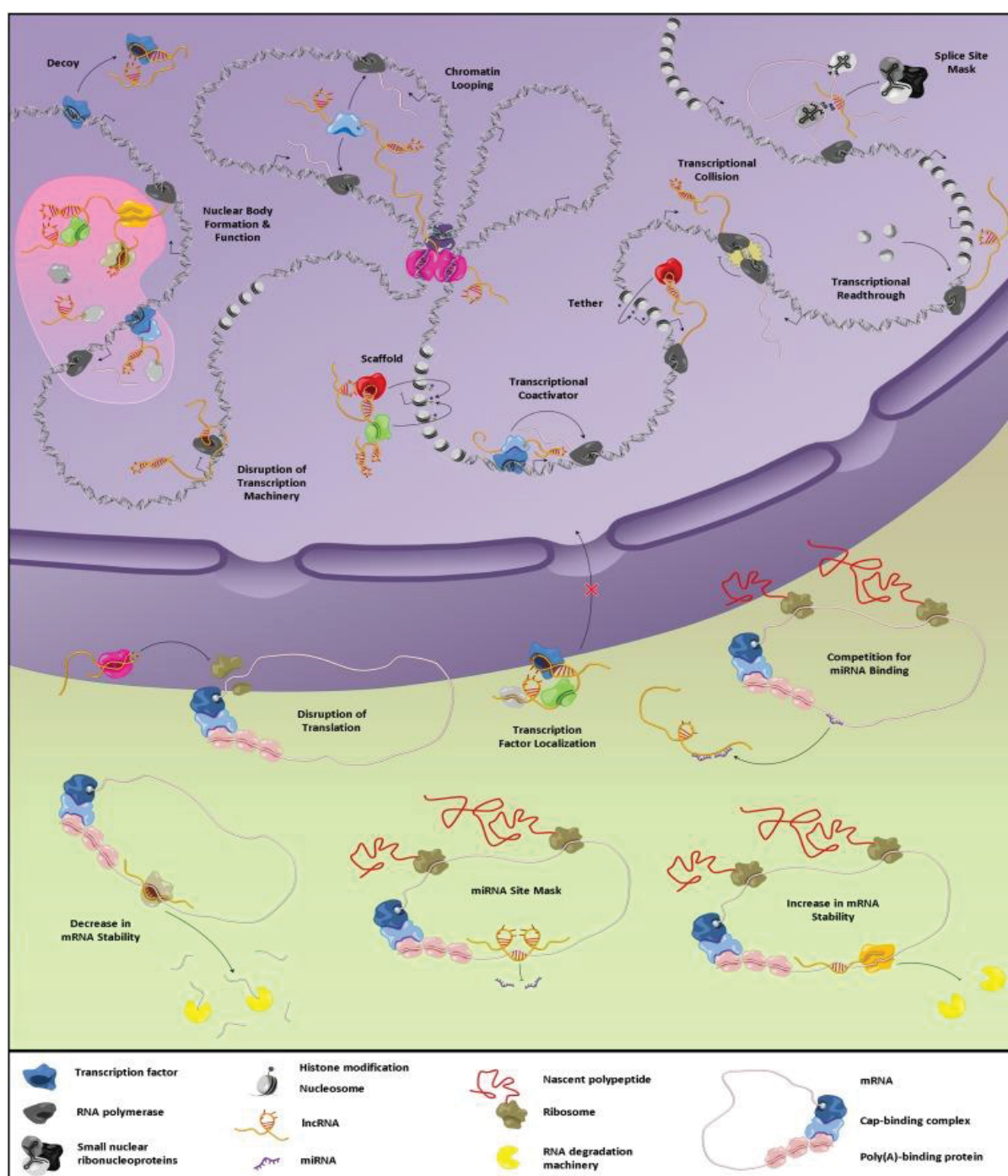


FIGURA 1.2: Possíveis mecanismos e funções nucleares e citoplasmáticas de lncRNAs. Os processos aqui demonstrados envolvem desde a regulação pré-transcricional, transcricional e pós-transcricional. Adaptado de Kung et al. 2013.

1.3 – lncRNAs associados a ribossomos e polissomos

Como os primeiros lncRNAs descobertos, no início da década de 90, eram de localização nuclear e exerciam suas funções especificamente na regulação da cromatina, regulação transcricional e formação da estrutura nuclear, criou-se a hipótese que estes transcritos estariam exclusivamente localizados e funcionais no núcleo. Atualmente, um crescente número de evidências, indicam uma vasta variedade de funções realizadas por lncRNAs citoplasmáticos.

Através de técnicas de *Ribosome Profiling*, uma vasta quantidade de lncRNAs citoplasmáticos foram identificados, estando estes, diretamente associados a maquinaria traducional (INGOLIA et al. 2011, 2014). Sendo posteriormente, visualizados através de ensaios de *Polysome Profiling* e sequenciamento (VAN HEESCH et al. 2014; CARLEVARO-FITA et al. 2015). Em paralelo, nosso grupo demonstrou a presença de lncRNAs diferencialmente expressos na fração polissomal de células-tronco derivadas de tecido adiposo, submetidas a diferenciação adipogênica. Interessantemente, estes lncRNAs possuem níveis de expressão similares aos dos mRNAs polissomais (DALLAGIOVANNA et al. 2017), o que nos fez prosseguir investigando esse fenômeno. Entretanto, as possíveis funções e mecanismos destes lncRNAs polissomais ainda não estão claras.

Uma das hipóteses, é de um possível potencial dos lncRNAs serem traduzidos em pequenos peptídeos, os quais seriam derivados de ORFs não convencionais. Com o crescimento de métodos de bioinformática, algumas análises foram realizadas com o intuito de uma maior compreensão acerca destes transcritos. Com isso, em um estudo pioneiro, associando *Ribosome Profiling* com análises computacionais, Guttman et al. (2014) argumentaram que a maioria dos lncRNAs não agem e não possuem função de codificar proteínas, mesmo possuindo ocupação ribossômica semelhante a RNAs codificantes. Isto, representaria um possível ruído do processo traducional, sendo os RNAs simplesmente traduzidos de forma generalizada.

Bánfai et al. (2012), através de bioinformática de dados, analisaram o potencial codificador de lncRNAs em duas linhagens celulares distintas. Demonstraram que, aproximadamente 92% dos lncRNAs (GENCODE v7) analisados não possuem capacidade codificadora, concluindo que, em apenas alguns casos excepcionais, os lncRNAs são traduzidos em micropeptídeos funcionais. De acordo com esses dados, Niazi & Valadkhan estimaram que os lncRNAs não possuem capacidade codificante, devido a características como: ORFs não convencionais, pequenas e com poucos códons de iniciação; conteúdo GC inferior aos mRNAs e apresentam similaridades com as regiões 3' UTRs de mRNAs (NIAZI & VALADKHAN 2012). No entanto, Ji et al. (2015), demonstraram que 40% dos lncRNAs expressos em células humanas podem ser traduzidos, apesar que a maioria dos putativos peptídeos derivados de lncRNAs serem altamente instáveis e aparentemente não possuem funções. Diante disso, dividiram os lncRNAs em três categorias distintas, sendo elas: (1) verdadeiros ncRNAs não traduzidos; (2) ncRNAs traduzidos em peptídeos não funcionais e; (3) ncRNAs traduzidos em proteínas não convencionais que exercem funções biológicas. De acordo, Ruiz-Orera et al. (2014), através da análise dos dados de *Ribosome Profiling* de seis espécies diferentes, verificaram que o padrão de ocupação dos ribossomos em lncRNAs é consistente com a tradução de pequenas ORFs (sORF), além do que, estes transcritos mostraram potencial codificador similar à sequências de genes codificadores de proteínas evolutivamente novas. Portanto, esses autores, hipotetizaram que os possíveis peptídeos derivados de lncRNAs podem agir como um repositório para a síntese de novos peptídeos funcionais. Apesar disso, as evidências ainda não dão suporte para essa hipótese, sendo necessário que novas pesquisas relacionadas sejam realizadas.

Mais recentemente, novos estudos lançaram luz acerca do potencial codificador dos lncRNAs. Em 2015, o grupo do Dr. Eric Olson, publicou um artigo descrevendo a descoberta de um micropeptídeo conservado de 46 aminoácidos (aa), o qual denominaram de myoregulin (MLN). Este peptídeo é derivado da pequena ORF (138 nt) do lncRNA LINC00948. Durante o desenvolvimento embrionário e adulto, MLN é altamente expresso no músculo esquelético, onde neste; interage com a ATPase SERCA impedindo a retomada de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático. Ao nocautear a proteína em camundongos, houve o aumento do fluxo de Ca^{2+} e o aumento do desempenho físico dos animais (ANDERSON et al.

2015). O mesmo grupo, no ano seguinte, publicou a descoberta de outro micropeptídeo denominado DWORF (34 aa) derivado do lncRNA LOC100507537. Localizado na membrana do retículo sarcoplasmático, atua aumentando a atividade da ATPase SERCA através da dispersão de seus inibidores (fosfolambam, sarcolipin e o próprio myoregulin) (NELSON et al. 2016).

De forma similar, D'Lima et al. (2016), descobriram um micropeptídeo conservado denominado NoBody (68 aa), derivado do lncRNA LINC01420. Nobody interage com proteínas de decapeamento de mRNAs, as quais promovem o decaimento destes transcritos. Sendo assim, células expressando NoBody não apresentam *P-bodies* detectáveis. Curiosamente, esse micropeptídeo causa a dispersão dos *P-bodies* e não sua degradação, possivelmente através da interação entre NoBody e a proteína EDC4 (*enhancer of decapping protein 4*). Além do que, Matsumoto et al. (2017) descobriram o também micropeptídeo conservado SPAR (90 aa), derivado do lncRNA LINC00961. SPAR está localizado no lisossomo tardio e interage com a ATPase-v para regular negativamente a ativação de mTORC1.

Mais recentemente, Huang JZ et al. (2017), descobriram um micropeptídeo (53 aa) derivado do lncRNA HOXB-AS3. A expressão desse peptídeo suprime o crescimento do câncer de cólon. Seu mecanismo de ação se dá através da ligação com os resíduos de arginina do hnRNP A1, o que antagoniza a regulação de hnRNP A1 no *splicing* do mRNA de piruvato quinase M (PKM), causando redução na formação de PKM e consequentemente suprimindo a reprogramação do metabolismo da glicose nas células cancerígenas. Pacientes com câncer de cólon com baixa expressão deste micropeptídeo possuem prognóstico ruim. Outros micropeptídeos derivados de lncRNAs também foram descritos em outros organismos como em camundongos, drosófila e *zebrafish* (CHNG et al. 2013; PAULI et al. 2014; KONDO et al. 2010)

Dito isso, podemos concluir que ao menos uma parcela de lncRNAs possuem potencial codificador de proteínas através de ORFs não convencionais (sORF) e esses peptídeos possuem propriedades de modular vias e processos biológicos de extrema importância e complexidade.

1.4 – Células-tronco Adultas

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas, com potencial de autorrenovação e que possuem capacidade de se diferenciarem em outros tipos celulares. Com base em sua origem e propriedades biológicas podem ser classificadas como embrionárias ou adultas.

O organismo humano possui uma vasta diversidade celular, as quais são derivadas de células-tronco e células progenitoras. Com o transcorrer do desenvolvimento embrionário, do zigoto até o estágio de mórula, caracteriza-se estas células como totipotentes, ou seja, são autorrenovativas e podem dar origem a todos os tipos celulares que compõem um organismo inteiro. Em seguida, ocorre a primeira diferenciação, onde uma parte das células se diferenciam para formar o trofoblasto e, a outra parte forma a massa celular interna (ICM – *Inner Cell Mass*) do blastocisto. Estas células da ICM apresentam características de pluripotência, isto é, possuem a capacidade de se diferenciarem em todos os tipos celulares do organismo, com exceção da linhagem trofoectodérmica (NICHOLS & SMITH 2009; MARTELLO & SMITH 2014; HACKETT & SURANI 2014). É nesse estágio do desenvolvimento que as células-tronco embrionárias são isoladas (THOMSON et al. 1998). A partir deste ponto, todas as células-tronco são consideradas adultas, podendo serem quiescentes ou podendo entrar em um estágio de diferenciação, sofrendo assim, uma especialização gradual em termos estruturais e funcionais (BERDASCO & ESTELLER 2011) (Figura 1.3). Células-tronco adultas são consideradas multipotentes, capazes de se diferenciarem em alguns tipos celulares de determinado folheto embrionário. Sendo encontradas em praticamente todos os tecidos, têm como função a manutenção da homeostase e integridade tecidual (BOYETTE e TUAN, 2014).

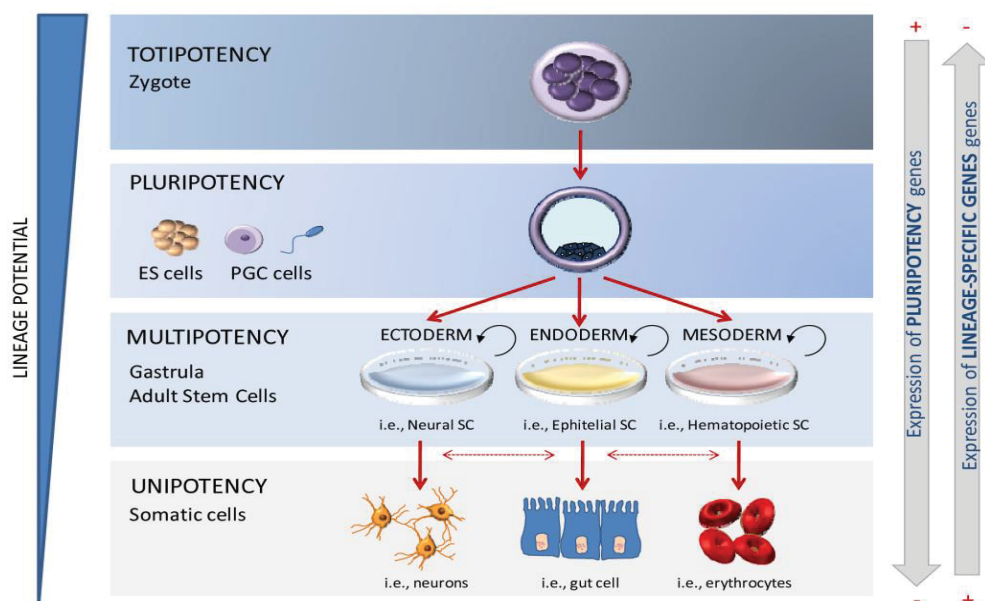


FIGURA 1.3: Potencialidade das células-tronco durante o desenvolvimento humano. Fluxo das células menos especializadas, e com maior potencial de diferenciação (zigoto); até as células completamente especializadas tecido-específicas (células somáticas). Adaptado de Berdasco & Esteller, 2011.

As células multipotentes adultas mais estudadas são as células-tronco hematopoiéticas (*HSC – Hematopoietic Stem Cells*) e as células-tronco mesenquimais (*MSC – Mesenchymal Stem Cells*) (KFOURY & SCADDEN 2015). Essa última, possui a capacidade de se diferenciar em células de origem mesodermas como osteoblastos, adipócitos, miócitos e condroblastos (FRESE, DIJKMAN & HOERSTRUP 2016). Desde o início, quando foram isoladas de medulas ósseas de camundongos (FRIEDENSTEIN et al. 1966; 1968); as MSC se tornaram uma atrativa fonte e alternativa terapêutica para um amplo espectro de aplicações clínicas no contexto da terapia celular e medicina regenerativa (PÉREZ-SILOS et al. 2016). Atualmente, mais de 600 ensaios clínicos estão em andamento para testar o uso terapêutico das MSC em uma enorme variedade de doenças (clinicaltrials.org, 2018). Entretanto, alguns critérios mínimos para caracteriza-las são necessários e foram implementados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular: sendo eles; (1) aderência à superfícies plásticas; (2) comprovação do potencial de diferenciação através de ensaios de indução adipogênica, osteogênica e condrogênica e (3) expressão de marcadores de superfície celular, como CD105, CD73 e CD90 (DOMINICI et al. 2006).

Essas células podem ser isoladas de diversos tecidos do organismo, como por exemplo, da medula óssea (GHASEMZADEH et al. 2018), tecido adiposo (BUNNELL et al. 2008), placenta (PELEKANOS et al. 2016), cordão umbilical, sangue de cordão umbilical (ZHANG et al. 2011), geléia de Wharton, fluido amniótico, âmnio (GHASEMZADEH et al. 2018), polpa dentária, ligamento periodontal (NAVABAZAM et al. 2013), sangue menstrual (DU et al. 2016) entre outros. As células mais utilizadas para pesquisa são provenientes da medula óssea, no entanto, o procedimento de extração e isolamento dessas células é altamente invasivo, doloroso e com baixa eficiência. Portanto, uma fonte de melhor e maior acesso à essas células se mostrou necessária. Ao se comprovar pela primeira vez a existência de MSC no tecido adiposo (ADSC – Adipose-derived Stem Cells; ou AT-MSC – Adipose Tissue Mesenchymal Stem cells) (ZUK et al. 2001), esta fonte se tornou muito interessante, visto uma maior facilidade de se obter as células quando comparada com a obtenção de células da medula óssea, além da obtenção de grande quantidade de material, o qual por sua vez, seria descartado (KERN et al. 2006).

Com isso, diversos estudos compararam as MSC derivadas da medula óssea (BMSC) com as MSC derivadas de tecido adiposo (ADSC), sendo visto que, ambas as células exibem expressão de marcadores e morfologia similares, porém as ADSC demonstram ter um potencial proliferativo maior; e as BMSC demonstram uma maior capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica (LI et al. 2015; DAVIES et al. 2015). Por isso, o estudo da biologia básica dessas células e dos processos de diferenciação celular se fazem necessários e importantes para uma maior compreensão a cerca da homeostase e desenvolvimento tecidual. Ainda, a diferenciação celular de células-tronco se apresenta como um excelente modelo de pesquisa para caracterizar e compreender as regulações transcricionais, pós-transcricionais e traducionais dos lncRNAs.

1.4.1 – Adipogênese

O tecido adiposo não possui forma definida no organismo, estando difuso por diferentes regiões do corpo. Por décadas, o tecido adiposo foi considerado sendo somente um reservatório de energia e tendo propriedade isolante, porém

atualmente, sabe-se que este tecido possui atividades regulatórias essenciais na homeostase do organismo inteiro. O elemento mais importante deste tecido é o adipócito, o qual possui em seu citoplasma um vacúolo lipídico que ocupa a porção central da célula e desloca os demais elementos e organelas para as regiões periféricas (FUJIMOTO E PARTON, 2011). Estas células secretam diversas proteínas que regulam diversos processos, tais como homeostase, pressão sanguínea, funções imunológicas, funções endócrinas, angiogênese e balanço energético, além da capacidade de liberarem rapidamente calorias para a utilização de outros órgãos (revisado em ROSEN E MACDOUGALD, 2006).

A adipogênese é o processo no qual MSCs ou pré-adipócitos se diferenciam para adquirir um perfil característico de adipócitos maduros. Este processo se divide em duas fases distintas, a primeira delas é caracterizada pela transição de um estado multipotente para um estágio celular definido como pré-adipócito. Este pré-adipócito não pode ser morfologicamente distinguível das células indiferenciadas, porém ele já se encontra em um estágio de comprometimento com a linhagem adipogênica. A segunda fase, também conhecida como fase final, os pré-adipócitos adquirem as características de adipócitos maduros – adquirindo toda a maquinaria necessária para síntese e transporte lipídico, sensibilidade a insulina e liberação de proteínas específicas. De forma interessante, a segunda fase é a mais estudada, sendo mais bem caracterizada de forma molecular e celular, visto a grande diferença entre as células iniciais (indiferenciadas) com as células comprometidas (diferenciadas) (ROSEN E MACDOUGALD, 2006; TANG E LANE, 2012). Os maiores reguladores da adipogênese são o PPAR γ 2 (*Peroxisome Proliferator-activated receptor γ*) e o C/EBP α (*CCAAT/enhancer binding protein α*). No entanto, PPAR γ 2 se torna essencial para o processo de diferenciação, visto que, possui a capacidade de promover a adipogênese em células nocautes para C/EBP α . Sendo que C/EBP α , não demonstrou o mesmo potencial em células nocautes para PPAR γ 2 (ROSEN et al. 2002). No entanto, o processo natural da adipogênese envolve a expressão de diversos outros fatores de transcrição, tais como: GLUT4, FABP4, LPL, SCD e FAS (MOSETI et al. 2016).

Nosso grupo vem pesquisando as etapas iniciais da diferenciação adipogênica (24h e 72h) de ADSCs, para uma maior compreensão do momento de comprometimento das células em pré-adipócitos, além de sua regulação transcricional e pós-transcricional. Portanto, observamos que o comprometimento

com a linhagem adipogênica se dá logo nos primeiros dias da indução (3 dias), mesmo não havendo mudanças fenotípicas associadas à adipogênese (SPANGENBERG et al. 2013). Ademais, verificou-se que a capacidade migratória dessas células submetidas à adipogênese é significativamente reduzida, além de apresentarem redução da proliferação. Outro fator importante, é que as células induzidas à diferenciação, demonstram uma diminuição da eficiência traducional e da atividade de síntese protéica, fato que afeta o controle da expressão gênica durante o processo de diferenciação (MARCON et al. 2017). Além disso, um aumento na produção de peróxido de hidrogênio é observado apenas nesses três dias iniciais de indução, sendo esse aumento relacionado ao comprometimento celular. Porém, são necessários sete dias de diferenciação para que haja a transição de um metabolismo glicolítico para oxidativo, sendo demonstrado um aumento no consumo de oxigênio durante este período. Portanto, é necessário um curto período de tempo de diferenciação para que haja mudanças no perfil energético e metabólico destas células induzidas (DREHMER et al. 2016).

Contudo, ainda pouco se entende do momento de comprometimento celular de células-tronco, sendo necessário um amplo espectro de abordagens moleculares e celulares para uma compreensão mais generalizada.

1.4.2 Osteogênese

A homeostase óssea adulta do esqueleto de mamíferos é mantida através da relação da atividade de osteoblastos e osteoclastos, responsáveis pela formação dos ossos e pela reabsorção óssea, respectivamente. Esse tecido possui diversas funções biológicas essenciais, sendo o principal tecido estrutural conectivo, protegendo órgãos internos vitais, crucial para a locomoção, suporte do sistema muscular, além de agir como um tecido endócrino que regula a homeostase mineral e sinaliza com diversos outros órgãos de extrema importância como hipotálamo, glândula paratireoide, tecido adiposo, entre outros (OLDKNOW, MACRAE e FARQUHARSON, 2015).

Os ossos possuem diferentes origens embrionárias, onde podem ser derivados da mesoderma paraxial, placa lateral do mesoderma e ectoderma da crista neural. *In vitro*, as células-tronco de origem mesenquimal induzidas a

diferenciação, se diferenciam em osteoblastos, podendo se tornar osteócitos, cercados pela matriz óssea, mecanismo esse, semelhante ao processo de ossificação *in vivo* (SOLTANOFF et al. 2009).

A diferenciação osteogênica de MSCs ainda não está bem compreendida e elucidada; e ocorre através de diversas etapas, sendo caracterizada por alterações na regulação da expressão gênica, metabólicas, estruturais e funcionais das células até se tornarem osteoblastos (STEIN e LIAN, 1993). Todo esse processo pode ser dividido em três estágios específicos (Figura 1.4), os quais de acordo com os perfis de expressão gênica, são caracterizados como sendo: Fase inicial, onde há intensa atividade de proliferação celular; Fase intermediária, onde ocorre a deposição e maturação da matriz extracelular; e a Fase final de mineralização da matriz óssea secretada (Figura 1.4) (KULTERER et al. 2007).

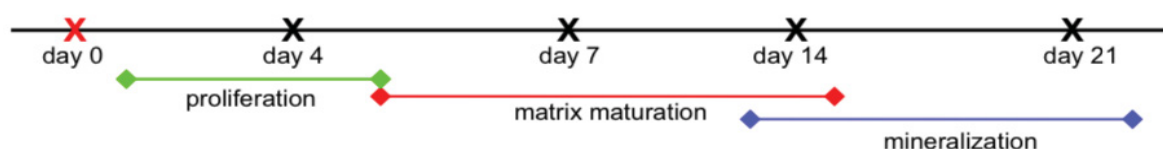


FIGURA 1.4: Estágios da diferenciação osteogênica: Indução (24h), proliferação, maturação da matriz extracelular e mineralização óssea. Adaptado de Kulterer et al. 2007.

Na fase inicial da diferenciação, as MSCs se diferenciam em células progenitoras osteocondrais, as quais podem se comprometer com a linhagem osteogênica ou condrogênica, porém ainda não se compreende em qual momento específico (hora ou dia) isso acontece. Quando estas células passam para a fase intermediária assumem um comprometimento específico, neste caso para a diferenciação osteogênica, onde passam a expressar o fator de transcrição RUNX2 (*Run related Transcription Factor 2*). A partir daí, as células passam a ser identificadas como pré-osteoblastos, e osteoblastos imaturos. Sendo na fase final, caracterizados como osteoblastos maduros e podendo até se diferenciarem à osteócitos (KULTERER et al. 2007; GROTTKAU e LIN, 2013). As células comprometidas passam a ter alta capacidade secretória e a expressar colágeno tipo I (Col1 – *type I collagen*), fosfatase alcalina (ALP – *alkaline phosphatase*), osteopontina (OPN – *osteopontin*), osteocalcina (OC – *osteocalcin*), entre outros (HOEMMAN et al. 2009).

Para que ocorra a diferenciação, as MSCs necessitam de sinalização celular específica, tanto de forma parácrina quanto autócrina. Com isso, as duas vias de indução osteogênica mais relevantes *in vitro* e *in vivo* são a via de TGF- β e BMP2, as quais compartilham alguns mediadores. A sinalização mediada por TGF- β é muito importante para a manutenção e expansão de células-tronco mesenquimais e de progenitores osteoblásticos (pré-osteoblastos), promovendo a proliferação, diferenciação e comprometimento à linhagem osteogênica através de vias como MAPKs e Smad 2 e 3, além de auxiliar nas vias de PTH, Wnt, BMP e FGF (CHEN, DENG & LI, 2012). Já em relação a via BMP, é amplamente conhecido seu papel na formação óssea durante o desenvolvimento de mamíferos, sendo que BMP2, 4, 5, 6 e 7 possuem alta capacidade de indução osteogênica, isto se dá também pela cooperação com vias como Wnt (Wnt3a), FGF, Notch, Shh, MAPKs e Smad. Além disso, as BMPs interagem com RUNX2 para estimular a expressão gênica osteoblástica, e RUNX2 é crucial para a execução da sinalização de BMP2 para a diferenciação osteogênica (JAVED et al. 2009; CHEN, DENG e LI, 2012).

1.5 – lncRNAs e diferenciação de MSCs

Os RNAs não codificantes longos já foram vistos diferencialmente expressos em várias etapas da diferenciação, indicando que estes transcritos possuem atividades regulatórias importantes para o destino celular. Essa expressão espaço-temporal específica dos lncRNAs pode estar ligada ao estabelecimento de programas e vias de expressão gênica determinantes para cada estágio da diferenciação (FATICA & BOZZONI 2014). No entanto, pouco ainda se compreende acerca da expressão, mecanismos de ação e funções destes lncRNAs durante a diferenciação de células-tronco mesenquimais.

Por exemplo, Zhang et al. (2017) visualizaram, através de microarranjo, a expressão de lncRNAs após 7 dias de diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas da medula óssea (hBMSC) e encontraram 785 lncRNAs regulados positivamente e 623 regulados negativamente, sendo que, em suas análises puderam identificar o lncRNA LOC100509635 como importante para o processo de diferenciação osteogênica visto que, sua expressão é aumentada durante os 7 dias de indução. Além do mais, ao superexpressar este gene houve maior diferenciação

e expressão de genes relacionados à osteogênese (RUNX2, OPN, OCN, COL1A2 e BSP), sendo que ao silenciar este gene os resultados foram contrários, demonstrando uma diminuição no processo de diferenciação. Entretanto, o exato mecanismo de ação deste lncRNA ainda não foi elucidado. Já Huang et al (2017), compararam a expressão de lncRNAs durante a diferenciação osteogênica de hADSCs (14 dias), tendo encontrado 1.460 lncRNAs com expressão aumentada e 1.112 com expressão diminuída, sendo que aproximadamente 61% dos lncRNAs diferencialmente expressos eram intergênicos. Utilizando-se microarranjo da mesma forma, Wang et al. (2015), identificaram 1.206 lncRNAs diferencialmente expressos, sendo 687 aumentados e 519 diminuídos após 14 dias de diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de medula óssea (hBMSC).

Curiosamente, até o momento, poucos estudos são realizados através de sequenciamento de segunda geração para a compreensão da expressão de lncRNAs durante os processos de diferenciação. Por exemplo, através de análises de bioinformática de dados de RNA-seq, Song et al. (2015) puderam comparar a expressão de lncRNAs de células-tronco mesenquimais imortalizadas indiferenciadas e diferenciadas em osteoblastos (28 dias) e obtiveram 574 lncRNAs diferencialmente expressos, sendo encontrado 217 novos lncRNAs anteriormente não-anotados. Em outro estudo, Luan et al. (2016) constataram 207 lncRNAs diferencialmente expressos durante a diferenciação adipogênica (7 dias) de hADSC, sendo que 109 lncRNAs estavam positivamente expressos e 98 negativamente expressos. Recentemente, nosso grupo publicou uma análise da expressão de lncRNAs associados aos polissomos durante a diferenciação adipogênica (3 dias) de hADSC, através de sequenciamento em larga escala (RNA-seq). Visualizou-se, 497 lncRNAs na fração polissomal das células induzidas e 518 lncRNAs nas células indiferenciadas, sendo que, os níveis de lncRNAs associados aos polissomos são comparáveis aos níveis de mRNAs, o que sugere que a presença destes lncRNAs na fração polissomal não é resultado de associações aleatórias e que estes transcritos apresentam função importante na regulação do processo de diferenciação de células-tronco (DALLAGIOVANNA et al. 2017).

Huang et al. (2016) estudaram os efeitos do lncRNA H19 na diferenciação adipogênica de hBMSC. Para isso, verificaram que a expressão de H19 e do miR-675, o qual é derivado do exon 1 do H19, está significativamente reduzida durante

a diferenciação adipogênica. Através de estratégias de silenciamento e superexpressão puderam confirmar que ao superexpressar este lncRNA houve uma inibição do acúmulo de lipídeos intracelulares e redução da expressão de genes relacionados a adipogênese (PPAR γ , C/EBP α e FABP4), sendo que ao silenciar, houve um aumento da diferenciação e da expressão dos marcadores adipogênicos. O possível mecanismo de atuação deste eixo H19/miR-675 se dá através da ligação direta do miR-675 a região 3'UTR dos mRNAs HDAC 4, 5 e 6, diminuindo assim sua atividade e tradução. A expressão destas HDACs é inversamente correlacionada a expressão de H19 e miR-675 durante a diferenciação adipogênica, sendo comprovado que a diminuição da expressão de HDAC 4, 5 e 6 inibe diretamente a diferenciação adipogênica. Este mesmo grupo, avaliou o papel do H19 na diferenciação osteogênica e verificaram que a expressão deste gene aumenta durante o processo osteogênico (14 dias). Com isso, ao realizarem a superexpressão de H19, houve um aumento significativo na diferenciação osteogênica *in vitro*, além do aumento de formação óssea *in vivo*, onde puderam demonstrar que o eixo H19/miR-675 estaria inibindo a expressão e tradução de TGF- β 1, o que subsequentemente causa a inibição da fosforilação de Smad3, fazendo com que Smad3 não possa recrutar as HDACs 4 e 5 para diminuir a expressão de Runx2 e OCN (HUNG et al. 2015; KANG et al. 2005).

Além disso, Liang et al. 2016 demonstraram o aumento da expressão de H19 durante a diferenciação osteogênica de hBMSCs, sendo que este lncRNA estaria agindo como um RNA de competição endógena (ceRNA) dos microRNAs miR-141 e miR-22, os quais possuem papel negativo na modulação da diferenciação osteogênica e da via Wnt/ β -catenina, demonstrando assim outro possível mecanismo de ação deste lncRNA. Corroborando com estes dados, Wang et al. (2015) demonstrou um aumento da expressão de H19 após realizar ensaio de microarranjo em hBMSC diferenciadas por 14 dias para osteogênese em comparação a células não diferenciadas.

De forma intrigante, foi demonstrado que a expressão de H19 teve um decréscimo durante o processo de diferenciação osteogênica de hADSC. E seu silenciamento causou um aumento de genes relacionados à osteogênese como ALPL e RUNX2, além disso a superexpressão de H19 causou redução nesses marcadores (HUANG et al. 2017). Ademais, o H19 foi visto up-regulado na fração polissomal de hADSC induzidas à adipogênese por 3 dias (DALLAGIOVANNA et

al. 2017). Estas discrepâncias podem ser, em parte, explicadas pela regulação tecido/célula-específica dos lncRNAs e de indutores diferentes dos processos de diferenciação.

Outro lncRNA, amplamente estudado e expresso em uma grande diversidade de células e condições, é o NEAT1. Gernapudi et al. 2016, demonstraram que a regulação positiva de NEAT1 é necessária para a adipogênese. Além disso, visualizaram que esse lncRNA é controlado pelo miR-140 o qual, interage com NEAT1, aumentando sua estabilidade. Concomitantemente, a expressão de miR-140 é aumentada durante todo o processo adipogênico, sendo que; a sua superexpressão promove a diferenciação adipogênica, enquanto seu nocaute, causa inibição (ZHANG et al. 2015). Por outro lado, Cooper et al. comprovaram a importância do NEAT1 no controle da regulação dos eventos de *splicing* alternativo de PPAR γ durante a adipogênese (COOPER et al. 2014).

Jin et al. (2017) analisaram a expressão do lncRNA MIAT em hADSC durante a diferenciação osteogênica e comprovaram que durante o processo de diferenciação sua expressão é significativamente reduzida. Após silenciarem este gene, visualizaram tanto *in vitro* como *in vivo* que sua redução ocasionou um aumento significativo na diferenciação osteogênica, indicando assim, que MIAT possui um importante papel como regulador da diferenciação de células-tronco, porém seu mecanismo de ação e possíveis funções são ainda desconhecidos.

Já Li et al. (2017) verificaram a expressão do lncRNA MEG3 durante a diferenciação celular de hADSCs e, constataram que a expressão deste lncRNA aumenta durante a diferenciação osteogênica e diminui durante a adipogênese. Após silenciar MEG3 puderam constatar que houve um aumento significativo na diferenciação adipogênica e inibição do processo osteogênico, um possível mecanismo seria através de ceRNA do miR-140-5p, o qual promove a adipogênese. Corroborando com os achados, Zhuang e colaboradores demonstraram que MEG3 promove a diferenciação osteogênica de hMSC, através da regulação transcricional de BMP4 (ZHUANG et al. 2014).

Zhu et al. (2016) constataram que a expressão do lncRNA HoxA-AS3 é aumentada durante a diferenciação adipogênica de hBMSC. Após seu silenciamento, foi possível verificar a diminuição na formação de lipídeos intracelulares e da expressão de marcadores adipogênicos. Contudo, estas células

silenciadas foram induzidas à osteogênese, causando um aumento dos depósitos de cálcio *in vitro* e da formação óssea *in vivo*. Investigou-se então os possíveis mecanismos de ação deste lncRNA, tendo este, função de associação com um membro do PCR2, o EZH2, o qual reprime a expressão de RUNX2, através da metilação de H3K27. Portanto, HoxA-AS3 age na diferenciação de células-tronco através da associação de proteínas repressoras de cromatina, causando um silenciamento em genes importantes para o processo de diferenciação.

Jia et al (2016; 2015) silenciaram o lncRNA-ANCR (DANCR) em células-tronco de polpa de dente (hDPSC), células-tronco da papila apical (hSCAP) e células-tronco de ligamento periodontal (hPDLSC) e verificaram que houve um aumento na diferenciação e nos marcadores após a indução adipogênica e osteogênica, o que indica que este lncRNA teria possível função na inibição dos processos de diferenciação de células-tronco. Assim como o lncRNA HoxA-AS3, Zhu et al. 2013 demonstraram que o ANCR também age se associando a EZH2 e reprimindo a expressão de RUNX2 no processo osteogênico, por exemplo.

Parece claro, que os lncRNAs possuem papéis cruciais durante o processo de manutenção e diferenciação de diferentes tipos de células-tronco e através de diversos mecanismos. No entanto, pouco se compreende acerca de suas funções e mecanismos, além de sua expressão espaço-temporal, visto a grande complexidade de se estudar estes transcritos. Portanto, se fazem necessários novos esforços para melhor compreender a biologia básica destes RNAs e da diferenciação celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil de expressão de RNAs não codificantes longos na fração total e polissomal durante o início da diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os RNAs não codificantes longos com expressão diferencial durante o início da diferenciação celular (24h), na fração total e polissomal;
- Classificar os lncRNAs segundo seu perfil de expressão, tipo e características específicas dos transcritos;
- Selecionar lncRNAs associados aos polissomos que tiveram aumento na expressão durante o início da diferenciação e validar os dados de sequenciamento em larga escala, além de analisar seu padrão de expressão durante todo o processo adipogênico e osteogênico;
- Comprovar a associação desses lncRNAs a maquinaria polissomal, através de *Polysome Profiling*;
- Analisar *in silico* o potencial codificador dos lncRNAs diferencialmente expressos durante a adipogênese e osteogênese.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Modelo de estudo e aspectos éticos

O presente trabalho utilizou de amostras de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo (hADSC), as quais foram coletadas e obtidas através de cirurgias eletivas de lipoaspiração, após assinatura de termo de consentimento informado pelos doadores (Quadro 1), seguindo as normas de pesquisa envolvendo humanos e com aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil (número 419/07).

QUADRO 1 – Perfil dos doadores de tecido adiposo

Doador	Sexo	Raça	Idade	Patologia
TL01	Feminino	Branca	27 anos	Não
TL02	Feminino	Branca	32 anos	Não
TAL10	Feminino	Branca	44 anos	Não

3.2. - Cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo

As células foram cultivadas em garrafas de 150 cm² em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB)(Gibco®), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e L-glutamina (2 mM), pH 7,2, sendo incubadas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (dióxido de carbono)(HEPA Class 100, Thermo Scientific). O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias até que fosse alcançada a confluência celular (75% a 85%). Quando confluentes, as células eram lavadas com solução salina balanceada sem sais de cálcio e magnésio (BSS-CMF) e desaderidas dos frascos através de incubação com tripsina (0,05%, Sigma®) por 5 minutos a 37°C. Após a inativação da ação enzimática, as células eram centrifugadas (700 x g, 8°C, 5 minutos) e ressuspensas em meio de cultivo, sendo então replaqueadas a uma densidade de 2x10³ células por cm², para isso as células eram contadas em câmara de Neubauer. As hADSC, foram previamente caracterizadas de acordo

com a expressão positiva de antígenos de superfície como CD105, CD90 e CD73 e expressão negativa para CD34 e CD45, através de citometria de fluxo (DOMINICI et al. 2006; REBELATTO et al. 2008).

3.3 – Diferenciação adipogênica e osteogênica

Para os ensaios de diferenciação celular, foram utilizadas células em passagem 4 a 6. Para a indução, foram utilizados os meios de diferenciação adipogênica (Poietics™ Adipogenic Induction Medium e Poietics™ Adipogenic Maintenance Medium, Lonza®) e diferenciação osteogênica (Poietics™ Differentiation Basal-Medium-Osteogenic, Lonza®), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram adicionados indutores ao meio de diferenciação adipogênica, sendo eles: Indometacina (200 µM), insulina (1 µg/mL), dexametasona (1 µM) e 3-isobutil 1-metilxantina (IBMX, 500 µM), GA-1000 (ácidos graxos), L-Glutamina e MCGS (Mesenchymal Cell Growth Supplement)(Poietics™ hMSC Adipogenic Induction SingleQuots®, Lonza®), para o meio de indução. Para o meio de manutenção da adipogênese, foi utilizado insulina (1 µg/mL), L-glutamina, MCGS e GA-1000. A diferenciação foi realizada por 14 dias, sendo o meio trocado a cada 3 dias, alternando entre indução e manutenção. Para a diferenciação osteogênica, os indutores adicionados ao meio de diferenciação foram: β-gliceralfosfato (10 mM), ácido ascórbico (50 µM) e dexametasona (1 µM) (Poietics™ hMSC Osteogenic SingleQuots®, Lonza®), sendo a diferenciação realizada por 21 dias e o meio trocado a cada 3 dias.

3.3.1 – Marcação através do método Vermelho Nilo (Adipogênese)

A eficiência da diferenciação adipogênica foi verificada através do método de coloração Vermelho Nilo, o qual é um corante que se associa a lipídeos neutros, como triacilglicerídeos e colesterol esterificado. A diferenciação foi verificada nos dias 1 (24h), 3 (72h), 7 e 14, em triplicata biológica e técnica. Para isso, as células em diferenciação foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo então, lavadas com PBS

por duas vezes e armazenadas. Posteriormente, as células foram incubadas com solução de Vermelho Nilo (estoque a 1 mg/mL dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO); diluído em PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente e lavadas 2 vezes com PBS, sendo então analisadas através de ELISA (*Enzyme Linked Immosorbant Assay*) com excitação de 485 de tamanho de onda. As mesmas placas, foram posteriormente incubadas com 4'6'diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI, 1:1000) por 20 minutos em temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBS, sendo então analisadas no microscópio de fluorescência invertido associado a software de deconvolução.

3.3.2 – Marcação através do Kit OsteoImage™ (Osteogênese)

Com um protocolo similar ao descrito anteriormente, a eficiência da diferenciação osteogênica foi realizada utilizando o kit OsteoImage™ (Lonza®), o qual é um corante fluorescente que se liga especificamente na porção de hidroxiapatita dos depósitos mineralizados. A diferenciação foi verificada nos dias 1 (24h), 3 (72h), 7 , 14 e 21, em triplicata biológica e técnica. Resumidamente, as células em processo de diferenciação foram lavadas com PBS e então fixadas por 10 minutos em temperatura ambiente com paraformaldeído 4%, sendo sequentemente lavadas. Posteriormente, foi adicionado aos poços o reagente já diluído conforme recomendação do fabricante, sendo as células incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram repetidamente lavadas e analisadas através de ELISA com excitação de 492 de tamanho de onda. Novamente, as mesmas placas, foram posteriormente incubadas com 4'6'diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI, 1:1000) por 20 minutos em temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBS, sendo então analisadas no microscópio de fluorescência invertido associado a software de deconvolução.

3.4 – Separação de RNA por gradiente de sacarose e purificação (*Polysome Profiling*)

O fracionamento polissomal foi realizado com algumas modificações dos procedimentos previamente publicados (HOLETZ et al. 2007 e SPANGENBERG et

al, 2013). Resumidamente, as hADSC em confluência de 70% foram induzidas para a diferenciação osteogênica e adipogênica por 24 horas, sendo então, tratadas com 0,1 mg/mL cicloheximida (Sigma-Aldrich®) por 10 minutos a 37°C, lavadas com solução BSS-CMF e então tripsinizadas. O precipitado foi lavado em PBS contendo 0,1 mg/mL cicloheximida e centrifugado a 2000 x *g* por 5 minutos (2 vezes). A lise celular foi realizada através da incubação das células com tampão polissomal (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 0,3 M NaCl e 0,1 µg/mL cicloheximida) por 10 minutos em gelo. O lisado foi centrifugado a 12000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi extraído cuidadosamente e adicionado ao gradiente de sacarose 10% a 50% (Biocomp model 108 Gradient Master) e centrifugado a 39000 rpm (rotor SW40, HIMAC CP80WX HITACHI) por 160 minutos a 4°C. O gradiente de sacarose foi fracionado através do sistema ISCO (Modelo ISCO 160 Gradient Former Foxy Jr. Fraction Collector), conectado a um detector de UV monitorando uma absorbância de 254 nm. Por fim, o RNA das frações total, livre, monossomal e polissomal foi extraído utilizando o kit Direct-zol™ RNA MicroPrep (Zimo Research®) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Uniscience).

3.5 – Construção da biblioteca de cDNA e RNA-Seq

Utilizou-se 1µg de RNA da fração total e polissomal para o sequenciamento (RNA-seq) de três replicatas biológicas independentes. A biblioteca de cDNA foi preparada com o kit TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation (Illumina) e os produtos purificados foram avaliados através do Agilent Bioanalyser (Agilent). O sequenciamento (RNA-seq) foi realizado na plataforma tecnológica (PDTIS-FIOCRUZ/RJ) de sequenciamento de ácidos nucleicos de nova geração Illumina HiSeq 2500 utilizando-se o kit RNA-seq de acordo com as recomendações do fabricante. Desta maneira, o processo de sequenciamento gerou, em média, 30 milhões de fragmentos sequenciados, de tamanho entre 85-100 nucleotídeos (*reads*).

3.6 – Análise dos dados

Para as análises dos dados brutos de sequenciamento contamos com a colaboração do Departamento de Bioinformática do Instituto Pasteur de Montevideo no Uruguai. O mapeamento e a contagem foi realizado através do pacote Rsubread R contra a nova versão do genoma humano GRCh38, sendo os parâmetros definidos para o mapeamento unicamente dos *reads* mapeados. Os genes diferencialmente expressos foram identificados com o pacote edgeR Bioconductor, sendo determinados entre as células induzidas e indiferenciadas considerando apenas aqueles genes com contagens superiores a 1 por milhão em pelo menos 3 condições. Valores de RPKM (*reads per kilobase per million reads*), uma medida de normalização, foram determinados para cada amostra para comparar a distinção de expressão. A correção para múltiplos testes foi realizada através de FDR (*False Discovery Rate*). Realizou-se análise de correspondência (COA), um método de redução de dimensão da matriz de contagens, para explorar associações entre variáveis. No COA é possível visualizar amostras e genes simultaneamente, revelando associações entre eles. Genes ou amostras situados próximos uns aos outros tendem a comportarem-se semelhantemente. Os resultados do sequenciamento foram depositados no banco de dados *ArrayExpress* (E-MTAB-6298).

3.7 – Análises *in silico*

Para as análises realizadas neste trabalho, foram utilizados diversos pacotes, programas, softwares e banco de dados publicamente disponíveis, sendo eles:

RStudio – Programa de desenvolvimento integrado para linguagem R (v1.0.153). <https://www.rstudio.com>

Ensembl – Um navegador com sequências genômicas de vertebrados. <https://www.ensembl.org/index.html>

UCSC Genome – Uma plataforma com sequências genômicas de vertebrados e invertebrados (KENT et al. 2002). <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

LNCipedia – Banco de dados de RNAs não codificantes longos contendo mais de 120 mil lncRNAs humanos anotados (VOLDERS et al. 2015). <https://lncipedia.org>

CPAT – Um programa que utiliza regressão logística para distinguir entre transcritos codificadores de proteínas e não codificantes com base em quatro características. Tamanho e qualidade da ORF (*Open Read Frame*), Pontuação de Fickett (relacionado a frequência de nucleotídeos, tamanho do transcrito e uso do códon) e pontuação de hexâmetro, relativa a dependência de aminoácidos adjacentes em uma determinada sequência de proteína (WANG et al. 2013). <http://lilab.research.bcm.edu/cpat/index.php>

CPC – Máquina de vetores de suporte criada com objetivo de identificar e distinguir transcritos com capacidade de codificar proteínas. Baseia-se em análise de algumas características intrínsecas como tamanho e qualidade da ORF, predição e comparação do peptídeo predito com o banco de dados de sequências de proteínas BLASTx e um frame score (KONG et al. 2007). <http://cpc.cbi.pku.edu.cn>

CPC2 – Uma máquina de vetores de suporte (SVM – support vector machine) a qual identifica o potencial codificador de RNAs. Para isso utiliza de análise de características como: Pontuação de Fickett (relacionado a frequência dos nucleotídeos e tamanho do transcrito), características da ORF (tamanho e integridade) e tamanho e ponto isoelétrico (pI) teórico do peptídeo predito (KANG et al. 2017). <http://cpc2.cbi.pku.edu.cn/index.php>

iSeeRNA – Outra máquina de vetores de suporte classificada para a identificação de lncRNAs. iSeeRNA identifica algumas características do RNA para a classificação em não codificantes e codificantes, sendo elas: conservação das sequências entre organismos, características da ORF (tamanho e proporção) e análise de frequência de di e tri nucleotídeos (SUN et al. 2013). <http://sunlab.cpy.cuhk.edu.hk/iSeeRNA/>

RepeatMasker – Os elementos transponíveis foram detectados através de análises com o programa RepeatMasker (v4.0.6), o qual utilizou como parâmetro a espécie

humana contra os bancos de dados Repbase (JURKA et al. 2015) e ou Dfam (HUBLEY et al. 2016). <http://www.repeatmasker.org>

RNAfold – Para o cálculo de energia livre mínima para a formação da estrutura secundária do RNA, foi utilizado o software RNAfold (v2.4.3), o qual utiliza parâmetros do banco de dados NNDB (TUNER & MATHEWS 2010; LORENZ et al. 2011). <http://rna.tbi.univie.ac.at>

BLASTp – Busca regiões de similaridade entre as sequências de proteínas investigadas. Os dados retornam com significância, cobertura do alinhamento, porcentagem de identidade, e organismo de origem da proteína. (JOHNSON et al. 2008). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

ORFFinder – Procura ORFs em sequências de DNA específicas, retornando o alcance de cada ORF juntamente com sua proteína predita (WHEELER et al. 2003). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

3.8 – Extração de RNA Total

O RNA total foi extraído das hADSC em diferenciação adipogênica nos dias 1 (24h), 3 (72h), 7, 14. Para as células em diferenciação osteogênica os mesmo pontos foram extraídos, apenas com adição do 21º dia de diferenciação. Para isso, foi utilizado o Kit RNeasy (QIAGEN) e tratamento em coluna com DNase I (QIAGEN), de acordo com instruções do fabricante. A concentração das amostras foi verificada através de espectrofotômetro (260 nm) NanoDrop® ND-1000 (Uniscience). O RNA das amostras foram estocados a -80°C.

3.9 – Síntese de cDNA pela transcriptase reversa

Para a síntese do DNA complementar foi utilizado 1 µg de RNA total em um volume máximo de 10 µL. Sendo o RNA total incubado com 10 µM de iniciadores oligodT (USB Corporation) a 70°C por 10 minutos, para anelamento. Sequentemente, foi adicionada a enzima Transcriptase Reversa (ImpromII™ Kit –

Promega) na presença de tampão 5x (ImpromII – Promega), MgCl₂ (25 mM), RNaseOUT (Invitrogen®) sendo a amostra então incubada a 42°C por 60 minutos e sequentemente por 70°C por 15 minutos em termociclador. Ao final do processo, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000.

3.10 – Análise de expressão qualitativa (RT-PCR)

Para a análise qualitativa da expressão dos lncRNAs escolhidos, foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores para amplificar regiões de genes de interesse específicos (Quadro 2). Sendo então, esses genes amplificados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen™, NY, EUA). As condições de amplificação foram padronizadas previamente aos experimentos, onde a temperatura de anelamento foi alterada para obter melhores resultados. Para cada reação em cadeia da polimerase utilizou-se de tampão de PCR (IBMP), Iniciadores (Forward e Reverse – 5 pmol), *Taq* DNA Polimerase e 50 ng de cDNA.

Para as reações de PCR foram testadas diversas condições para cada um dos genes analisados. Para os lncRNAs RP1-272L16.1, LINC01018, PLCE1-AS1 e LINC00607, um programa de PCR Touchdown foi utilizado para aumentar a eficiência de amplificação dos fragmentos (Quadro 3).

QUADRO 2: Sequências e tamanho do produto dos iniciadores

Nome	Ensembl ID	Sequência 5' -> 3'	Amplicon
AC104654.2 - F	ENSG00000234362	CTGGGGCAGACTTGAACCAT	204 bp
AC104654.2 - R		AGGTCGCTGAAGTGTCACAG	
SH3RF3-AS1 - F	ENSG00000259863	TTCGTTCCGGTGTAGGTGTG	262 bp
SH3RF3-AS1 - R		AAAATTGGAGCGGGGGTTCA	
PLCE1-AS1 - F	ENSG00000268894	TCATTATTGGCAGGTCGGGG	165 bp
PLCE1-AS1 - R		CGATTGTGTTAAACATCAGGGGT	
LINC00607 - F	ENSG00000235770	GTCTCAGCCTGCTGGAATCA	297 bp
LINC00607 - R		TCCGGCTTCCCAGGTATCTT	
HOXC13-AS - F	ENSG00000249641	GCTCCTTGGAGCAGTACACC	224 bp
HOXC13-AS - R		TTGAGGGGTGCAGTAGGTCT	
RP1-272L16.1 - F	ENSG00000224260	CCCAGACTTCAGCGAGTTGT	143 bp
RP1-272L16.1 - R		ACATCTGCCTTCGCCCTATG	

LINC01018 - F	ENSG00000250056	CTGAGGCCAACACTGGGAAT	231 bp
LINC01018 - R		GGAAAGTCCGAGACCACGTT	
FABP4-F	ENSG00000170323	ATGGGATGGAAAATCAACCA	103 bp
FABP4-R		GTGGAAGTGACGCCTTTCAT	
PPARG2-F	ENSG00000132170	ATTACAGCAAACCCCTATTCC	139 bp
PPARG2-R		GGCATCTCTGTGTCAACCAT	
COL1A1-F	ENSG00000108821	GGCCATCCAGCTGACCTTCC	205 bp
COL1A1-R		CGTGCAGCCATCGACAGTGAC	
ALP-F	ENSG00000162551	TACAAGGTGGTGGGCGGTGAACGA	92 bp
ALP-R		TGGCGCAGGGGCACAGCAGAC	
GAPDH-F	ENSG00000111640	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	122 bp
GAPDH-R		TGGTTCACACCCATGACGA	
GFP-F		TGAAGTTCGAGGGCGACACC	77 bp
GFP-R		GATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGT	

QUADRO 3: Programa de PCR Touchdown

Temperatura	Tempo (min)	Ciclos
95°C	05:00	1
95°C	00:30	
68°C	00:30	3
72°C	00:30	
95°C	00:30	
67°C	00:30	3
72°C	00:30	
95°C	00:30	
66°C	00:30	3
72°C	00:30	
95°C	00:30	
65°C	00:30	3
72°C	00:30	
95°C	00:30	
64°C	00:30	3

72°C	00:30	
95°C	00:30	
63°C	00:30	3
72°C	00:30	
95°C	00:30	
62°C	00:30	3
72°C	00:30	
95°C	00:30	
61°C	00:30	3
72°C	00:30	
95°C	00:30	
60°C	00:30	11
72°C	00:30	
72°C	03:00	1
16°C	∞	

3.11 – Eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose 2%, para a realização da eletroforese. Para a corrida, foram utilizadas cubas horizontais, tampão TBE (tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), em voltagem média de 90V. Após a corrida, os géis foram corados com a solução GelRed™ (Biotium) por 30 minutos e fotografados em transiluminador (L-Pix, Loccus Biotechnology).

3.12 – Associação de lncRNAs aos polissomos

Para comprovar a associação dos lncRNAs com os polirribossomos foi realizado novamente uma separação por gradiente de sacarose (*Polysome*

Profiling) de células induzidas a diferenciação por 24 horas, tanto para a diferenciação osteogênica como para a adipogênica. Para isso, foi realizado procedimento similar ao item 2.5, porém com a adição de puomicina no momento da lise celular por 30 minutos. Com isso, a lise celular foi realizada através da incubação das células com tampão polissomal (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 0,3 M NaCl – sem adição de ciclohexemida) por 30 minutos em gelo. O lisado foi centrifugado a 12000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi extraído cuidadosamente e adicionado ao gradiente de sacarose 10% a 50% (Biocomp model 108 Gradient Master) e centrifugado a 39000 rpm (rotor SW40, HIMAC CP80WX HITACHI) por 160 minutos a 4°C. O gradiente de sacarose foi fracionado através do sistema ISCO (Modelo ISCO 160 Gradient Former Foxy Jr. Fraction Collector), conectado a um detector de UV monitorando uma absorbância de 254 nm. Por fim, o RNA das frações total, livre, monossomal e polissomal foi extraído utilizando o kit Direct-zol™ RNA MicroPrep (Zymo Research®) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Uniscience). Para a quantificação e comparação nas análises de RT-PCR, no momento da síntese de cDNA, utilizou-se de uma sequência já conhecida (*RNA spike-in*) e padronizada do RNA GFP (*Green Fluorescent Protein*).

4 RESULTADOS

4.1 – Cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano

As células-tronco isoladas dos pacientes (item 3.1 - Quadro 1) foram previamente caracterizadas em nosso laboratório (Apêndice 1) e então utilizadas para os experimentos aqui demonstrados. O cultivo foi realizado de acordo com protocolo inicial (item 3.2), sendo estas células cultivadas em garrafas plásticas em meio de cultivo suplementado. As trocas de meio ocorreram a cada 3 dias e o repique celular realizado quando as células alcançavam 70% a 80% de confluência. Alíquotas das amostras foram estocadas em nitrogênio líquido (-196°C) entre as passagens 2 a 5 para os futuros experimentos.

Para o ensaio de *Polysome Profiling*, as células foram cultivadas e então induzidas a diferenciação osteogênica e adipogênica durante 24 horas. Pequenas mudanças morfológicas podem ser vistas com o início da indução osteogênica (singela redução do tamanho) e adipogênica (discreto aumento do citoplasma), porém não significativas em relação a formação de matrizes mineralizadas e vesículas lipídicas, respectivamente (Figura 2).

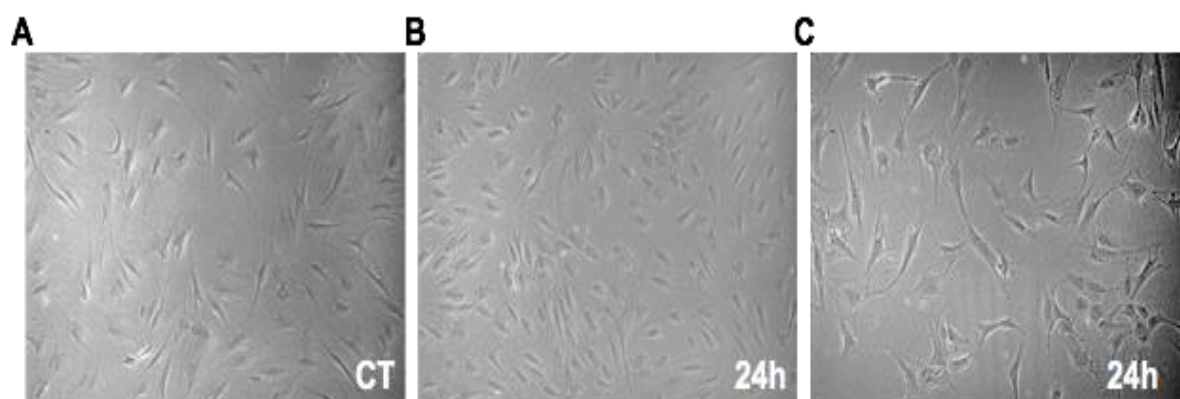


FIGURA 2: Características e morfologia das células-tronco derivadas de tecido adiposo durante o início da diferenciação (24h). (A) Células em estágio indiferenciado (CT), (B) células induzidas a osteogênese e (C) células induzidas a adipogênese.

4.2 – Perfil polissomal das célula-tronco adultas

Para a realização do sequenciamento em larga escala, as amostras foram separadas de acordo com suas frações celulares, sendo o foco deste trabalho as frações TOTAL e POLISSOMAL. Para proceder este fracionamento, realizamos o protocolo de Perfil Polissomal (*Polysome Profiling*), o qual tem por objetivo isolar as os RNAs localizados nas frações livre, monossomal e polissomal. Este método consiste em uma separação do conteúdo citoplasmático, através de ultracentrifugação e gradiente de sacarose (10% a 50%), com fracionamento registrado por absorbância (Figura 3).

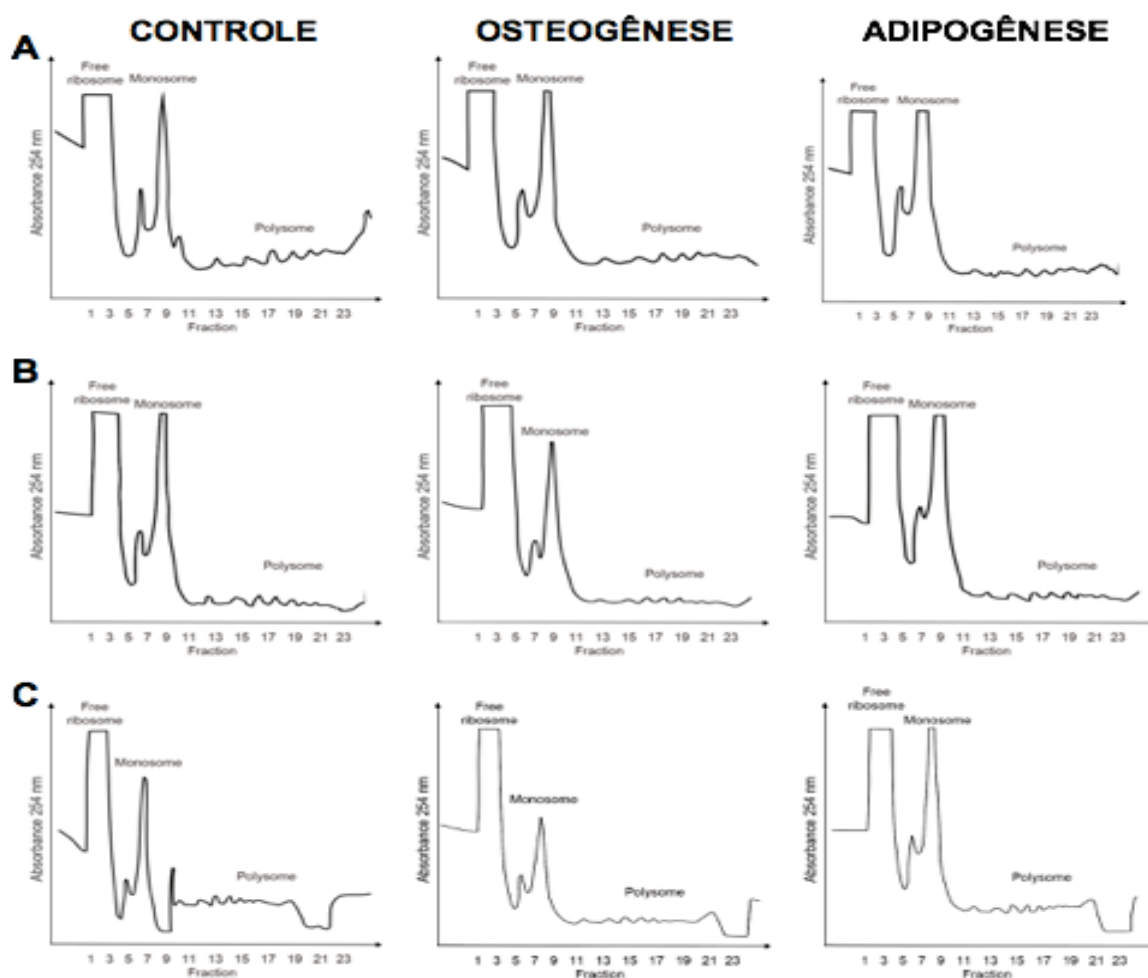


FIGURA 3: Perfil polissomal das amostras em estado indiferenciado (Controle) e induzidas por 24h a diferenciação osteogênica e adipogênica. (A) Perfil polissomal das amostras do paciente TL01, (B) do paciente TL02 e advindas do paciente TAL10 (C). No eixo y, a representação da absorbância verificada em 254 nm; no eixo x as frações isoladas.

Não foi possível visualizar mudanças drásticas nos perfis polissomais, no entanto, parece que as células induzidas a diferenciação adipogênica (24h) possuem uma tendência a um maior pico monossomal comparadas as células induzidas à osteogênese e consequentemente uma fração polissomal reduzida.

4.3 – Sequenciamento de nova geração em larga escala (RNA-Seq)

O sequenciamento das amostras da fração total, livre e polissomal (RNA-seq) foi realizado através da plataforma Illumina HiSeq, de acordo com as recomendações do fabricante. As análises dos dados brutos do sequenciamento foram realizadas em parceria com o departamento de bioinformática do Instituto Pasteur de Montevideo no Uruguai.

Ao analisarmos o sequenciamento das amostras da fração total, polissomal e livre das células indiferenciadas (CONTROLE), induzidas a osteogênese (OSTEO) e induzidas a adipogênese (ADIPO), notamos que a cobertura do sequenciamento foi efetiva, visto que foi obtido uma média de aproximadamente 16 milhões de *reads* mapeados (83,2% dos *reads* processados) para as amostras CONTROLE; 15 milhões de *reads* mapeados (84,6% dos *reads* processados) para as amostras OSTEO e 15 milhões de *reads* mapeados (80,2% dos *reads* processados) para as amostras ADIPO (Quadro 4).

QUADRO 4 – Médias da cobertura do sequenciamento das frações total, polissomal e livre (n=3)

Samples	Processed Reads	Mapped Reads	%Mapped Reads	Genes Detected
CT_TOTAL	19.150.171	16.061.975	81,2%	20.671
CT_POLI	18.136.708	15.117.522	83,6%	19.926
CT_LIVRE	19.706.240	16.743.804	85%	8.894
OSTEO_TOTAL	16.257.536	13.306.815	82,2%	21.973
OSTEO_POLI	27.307.303	23.249.099	85,1%	22.066

OSTEO_LIVRE	9.898.169	8.532.488	86,4%	11.434
ADIPO_TOTAL	16.660.387	14.324.552	84,9%	22.696
ADIPO_POLI	20.534.769	16.726.975	81,2%	20.832
ADIPO_LIVRE	16.242.846	12.600.353	74,4%	11.373

CT: Controle; OSTEO: Osteogênese; ADIPO: Adipogênese e POLI: Polissomal.

Levando em consideração os valores de CPM (*counts per million*), igual ou maior que um, em pelo menos uma das três amostras, foram vistos um total de 550 lncRNAs nas amostras CT_TOTAL, 472 lncRNAs nas amostras CT_POLI e 77 lncRNAs nas amostras CT_LIVRE. Nas amostras induzidas a diferenciação osteogênica, os números foram de 615 lncRNAs na OSTEO_TOTAL, 578 na OSTEO_POLI e 92 lncRNAs na OSTEO_LIVRE. Já na diferenciação adipogênica; 703 lncRNAs na ADIPO_TOTAL, 497 lncRNAs na ADIPO_POLI e 99 lncRNAs na ADIPO_LIVRE.

Uma maior expressão de lncRNAs foi vista na fração livre, ou seja, não associados a ribossomos. Estes transcritos podem estar agindo como reguladores pós-transcricionais, como RNAs de competição endógena (ceRNAs), interagindo com proteínas de ligação à RNA e ou outros RNAs (Figura 4A). Em relação a expressão nas frações total e polissomal, houve semelhança no padrão de expressão de lncRNAs tanto nas células induzidas a diferenciação, como nas indiferenciadas (CT). O padrão de expressão dos genes que codificam proteínas foi completamente distinto dos lncRNAs, sendo encontrados em sua maioria nas frações total e polissomal (Figura 4B).

Com isso, decidimos prosseguir nossas análises com os lncRNAs expressos na fração TOTAL e POLISSOMAL somente.

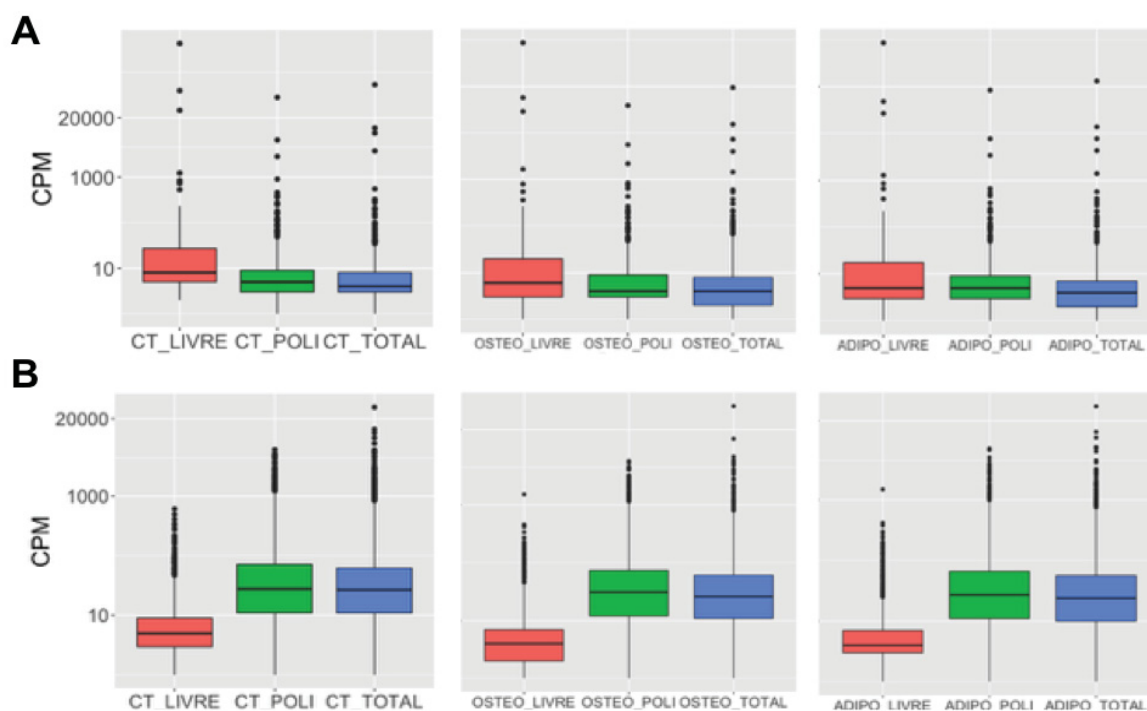


FIGURA 4: Padrão de expressão dos genes codificadores de proteínas e RNAs não codificantes longos (lncRNAs) nas diferentes frações sequenciadas. (A) CPM dos lncRNAs expressos nas frações livre, total e polissomal das células-tronco indiferenciadas e induzidas a osteogênese e adipogênese (B) padrão de expressão dos genes codificadores de proteínas nas frações livre, total e polissomal. ****P-value* < 0,001.

4.4 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAS NÃO CODIFICANTES LONGOS NO INÍCIO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

4.4.1 – Osteogênese

A expressão dos lncRNAs expressos durante o início da diferenciação osteogênica de células-tronco adultas (24h) foi estudada após as análises de bioinformática dos dados brutos do sequenciamento em larga escala (RNA-seq) das frações TOTAL e POLISSOMAL. Com isso, observamos que na fração total e polissomal, 77% e 79% dos transcritos sequenciados foram de genes codificadores de proteínas, sendo os restantes 23% e 22% de genes não codificantes e dentre eles, 8% e 6% de lncRNAs, respectivamente (Figura 5).

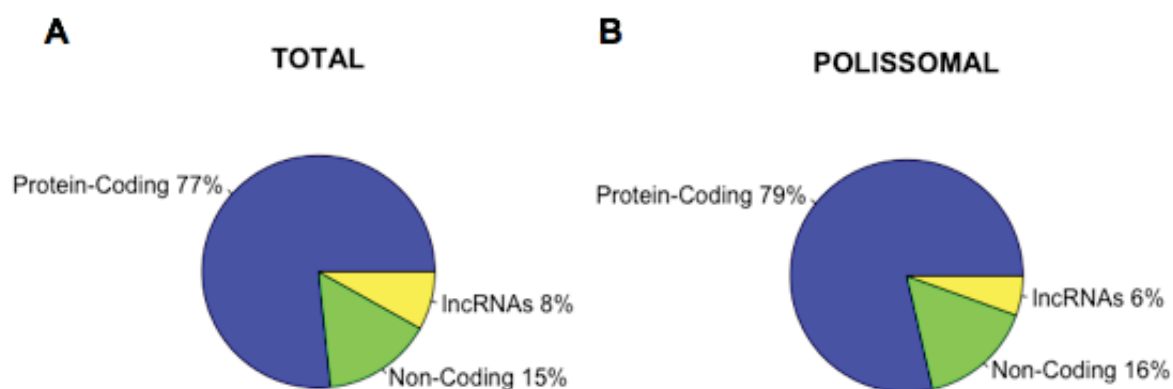


FIGURA 5: Porcentagem de genes identificados no RNA-seq de células-tronco induzidas a diferenciação osteogênica (24h). (A) Representação dos genes expressos na fração TOTAL e (B) na fração POLISSOMAL.

Verificou-se a expressão de 1304 lncRNAs na fração TOTAL, sendo em sua maioria de transcritos *Antisense*, seguidos de RNAs intergênicos (*lincRNAs*). Já em relação a fração POLISSOMAL, 836 lncRNAs foram identificados, sendo em sua maioria *lincRNAs* (Figura 6).

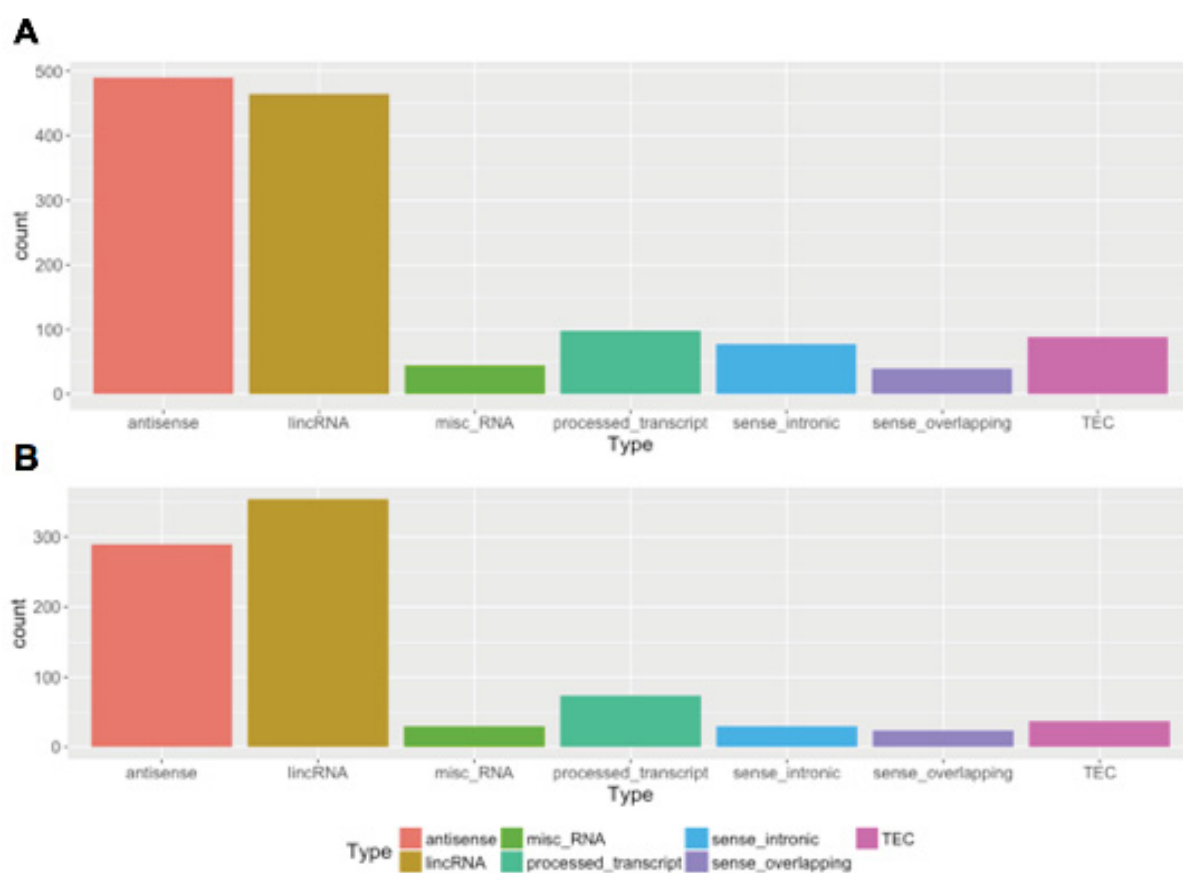


FIGURA 6: Distribuição dos lncRNAs de acordo com sua classificação e nomenclatura. (A) lncRNAs expressos na fração TOTAL e (B) lncRNAs expressos na fração POLISSOMAL.

4.4.2 – Expressão diferencial de lncRNAs no início da osteogênese (24h)

Os critérios utilizados para classificar os genes diferencialmente expressos (DEGs - do inglês, *Differentially Expressed Genes*) foram: $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$ e ≤ -1 ; e visando corrigir os erros associados, utilizamos valores de FDR (*False Discovery Rate*) $\leq 1\%$. Com isso, pudemos verificar na fração TOTAL das células induzidas à diferenciação osteogênica, um total de 46 lncRNAs diferencialmente expressos (Quadro 5), ou seja, apenas 3,52% dos 1304 lncRNAs identificados no RNA-Seq. Porém, ao compararmos somente os DEGs relacionados aos genes não codificantes (pseudogenes, snRNAs, snoRNAs, miRNAs), os 46 lncRNAs representam 70,7% de genes diferencialmente expressos desta classe (Quadro 5). Destes 46 lncRNAs, 29 se encontram positivamente expressos e 17 negativamente expressos (Apêndice 6.1 e 6.2).

QUADRO 5 – Expressão de genes da fração total e diferencialmente expressos

TIPO	TOTAL	DEGs
Non-coding	2447	65
lncRNAs	1304	46

Curiosamente, constatamos 73 lncRNAs diferencialmente expressos na fração POLISSOMAL (Quadro 6), o que representa 8,73% dos lncRNAs sequenciados nesta fração. Sendo que, ao compararmos somente os DEGs dos genes não codificantes, os 73 lncRNAs equivalem a um total de aproximadamente 63%. Dos 73, 49 lncRNAs estão aumentados e 24 diminuídos (Apêndice 7.1 e 7.2).

QUADRO 6 – Expressão de genes polissomais e diferencialmente expressos

TIPO	POLI	DEGs
Non-coding	2415	116
lncRNAs	836	73

Ao compararmos ambas as frações, verificamos que apenas 14 lncRNAs aumentados são comuns entre elas, o equivalente a aproximadamente 18% dos transcritos somados (Figura 7A). Já em relação aos transcritos diminuídos, apenas 7 (17%) dos lncRNAs são compartilhados (Figura 7B).

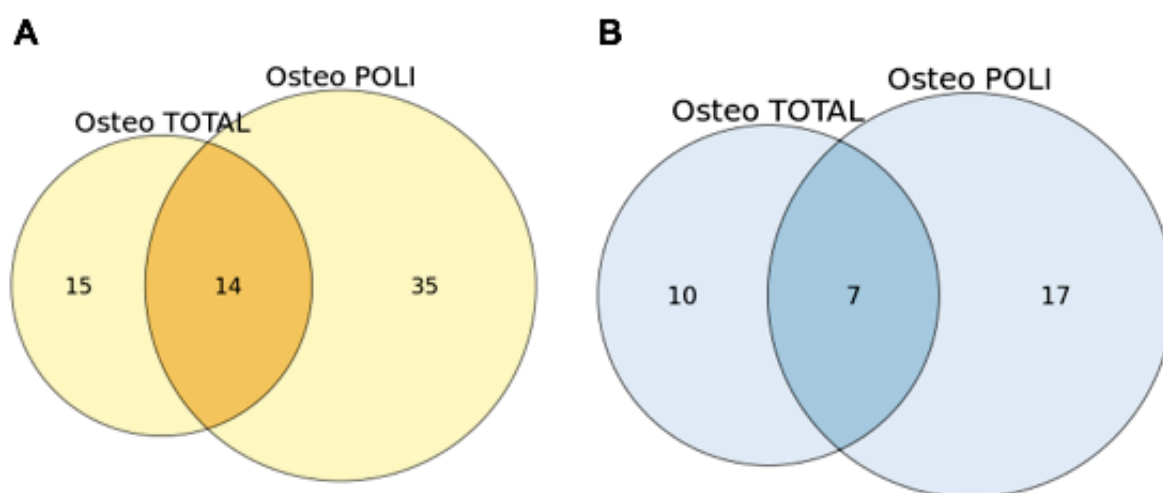


FIGURA 7: Diagrama de Euler relacionando os lncRNAs diferencialmente expressos positivamente (A) e negativamente (B) na fração TOTAL e POLISSOMAL durante o início da diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo.

Através desses diagramas, podemos inferir que os lncRNAs encontrados na fração total, ou seja, RNAs poliadenilados, expressos no citoplasma e no núcleo; e os lncRNAs encontrados na fração polissomal, associados exclusivamente a maquinaria traducional; provavelmente possuem atividades e mecanismos de ação distintos durante o processo de diferenciação celular. Sendo então, de grande importância, a investigação a cerca destes lncRNAs fração-específicos e suas características.

Os lncRNAs específicos de cada fração, e exclusivos de cada condição (comuns, somente TOTAL e somente POLISSOMAL) estão descritos no Apêndice 8. Curiosamente, lncRNAs anteriormente descritos como sendo de localização somente nuclear puderam ser vistos associados aos polissomos, como por exemplo o H19, visto aqui somente up-regulado na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica, corroborando assim para um possível papel citoplasmático deste transcrito (VAN HEESCH et al. 2014; DALLAGIOVANNA et al. 2017).

4.4.3 – Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração Total

Verificamos a distinção da expressão de lncRNAs em ambas as frações, portanto, se fez necessário uma caracterização mais detalhada destes transcritos. Com isso, classificamos esses lncRNAs de acordo com sua posição genômica, sendo que 47,5% dos transcritos diferencialmente expressos na fração total são intergênicos (*lincRNAs*) (Figura 8).

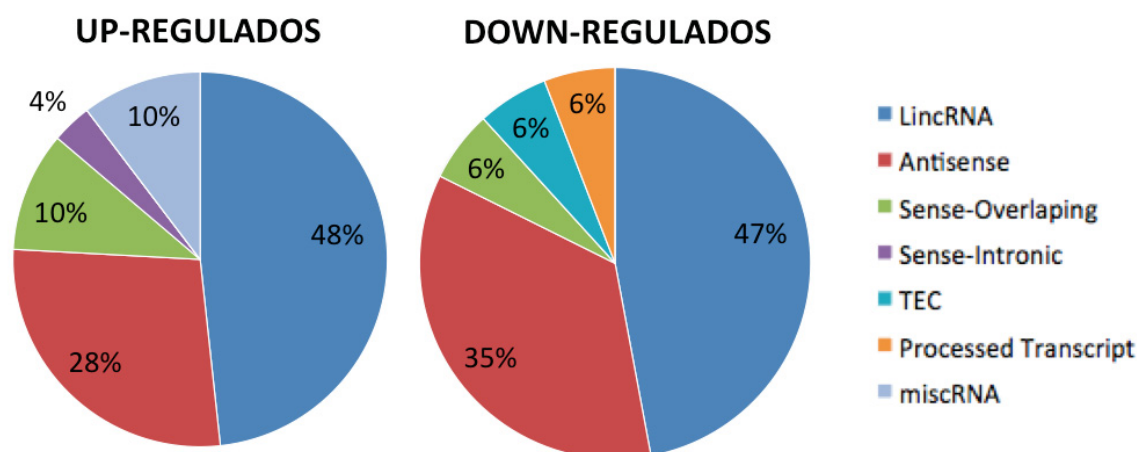


FIGURA 8: Classificação dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração TOTAL da diferenciação osteogênica de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo (24h), divididos entre genes aumentados e diminuídos, respectivamente.

Assim como os mRNAs, os transcritos de lncRNAs sofrem *splicing* alternativo, gerando assim, diferentes RNAs de um mesmo gene. Com isso, os 29 lncRNAs com expressão aumentada possuem um total de 75 transcritos (média de 2,5 transcritos alternativos por gene), e os 17 lncRNAs com expressão diminuída possuem um total de 65 transcritos (média de 3,8 transcritos alternativos por gene).

Até o presente momento, não se tem registrado na literatura científica uma descrição extensa dos lncRNAs expressos durante os processos de diferenciação de células-tronco mesenquimais, principalmente nos primeiros estágios da

diferenciação. Por isso, outras formas de descrever e classificar estes lncRNAs podem e devem ser realizadas para uma maior compreensão.

Sendo assim, analisamos o comprimento destes transcritos e constatamos que a maioria dos lncRNAs aumentados (65%) possuem comprimento entre 200 a 1000 nucleotídeos (nt), sendo a média destes transcritos de 1588 nucleotídeos (Figura 9A). Além disso, podemos visualizar na Figura 9B, a distribuição de tamanho relacionado a classe destes lncRNAs, o que por exemplo, nos mostra que lncRNAs *sense-overlapping* possuem em média um comprimento maior que outros lncRNAs, visto o tamanho de seus genes codificadores de proteínas sobrepostos. O menor RNA encontrado foi o NR2F1-AS1 com 271 nucleotídeos e o maior o NEAT1 com 22743 nt. Quando avaliamos a quantidade de exons destes RNAs, verificamos uma média de 3 exons por transcrito, sendo que a maioria destes lncRNAs (35%) possuem 2 exons (Figura 9C e 9D). Além disso, ao analisarmos a distribuição cromossômica destes RNAs, podemos visualizar que, com exceção dos cromossomos 7, 9, 13, 19, 20, 22 e X, ao menos um lncRNA foi encontrado em todos os outros cromossomos (Figura 9E).

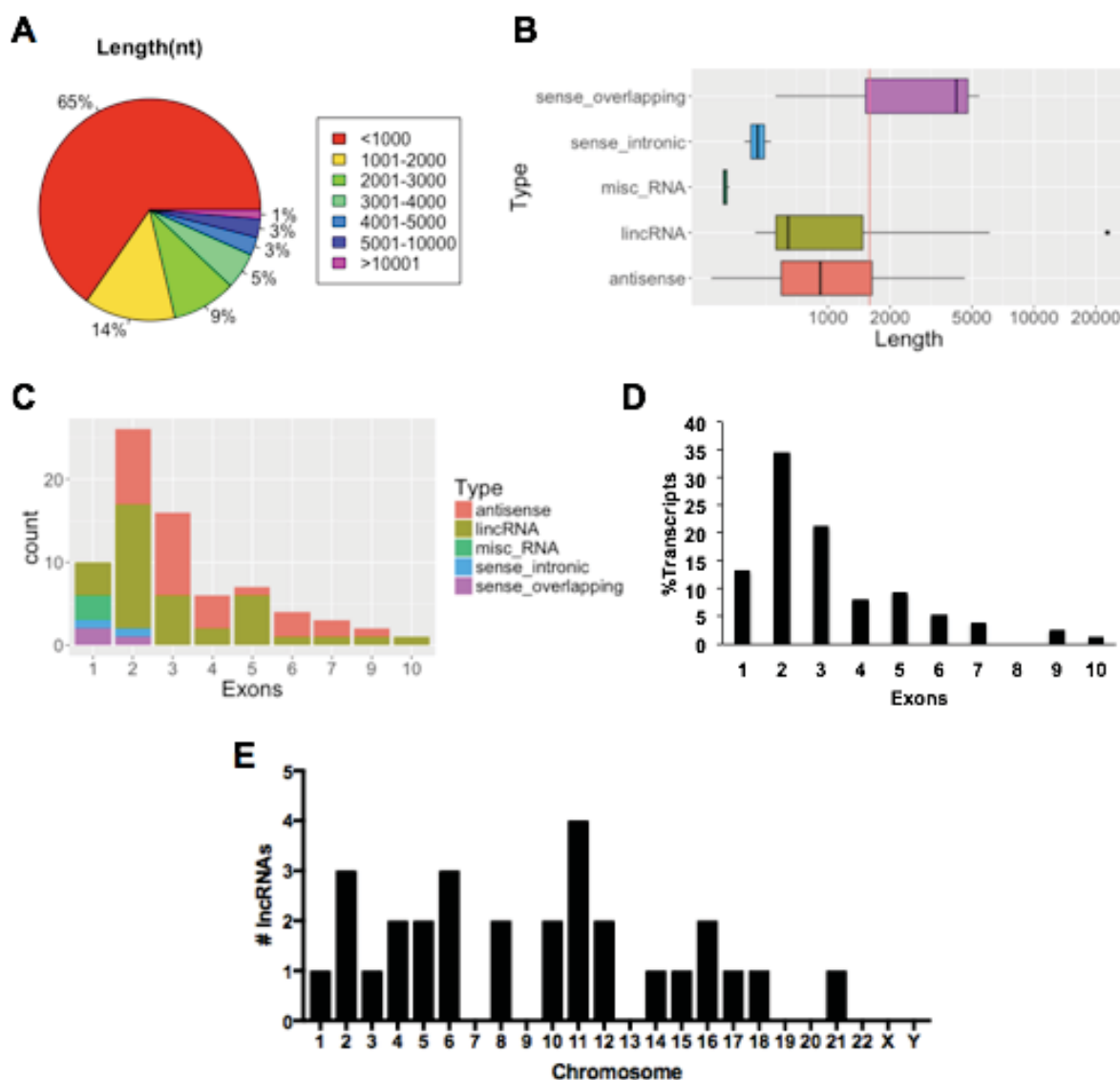


FIGURA 9: Descrição dos lncRNAs aumentados na fração TOTAL durante a osteogênese (24h) de células-tronco adultas. (A) Visualização da porcentagem de transcritos e seus comprimentos (nt) e, (B) distribuição de tamanho por classe, média determinada por reta vermelha, (C) distribuição dos lncRNAs em suas classes relacionado à quantidade de exons, (D) porcentagem de exons por transcritos e (E) distribuição cromossômica.

Em relação aos lncRNAs com expressão diminuída, confirmamos que 68% possuem comprimento entre 200 e 1000 nucleotídeos, sendo a média de 1561 nt, devido a grande variação de comprimento dos transcritos (Figura 10A e 10B). O menor RNA encontrado foi o MIR530HG com 332 nucleotídeos e o maior o RP1-309I22 com 28929 nt. Novamente, ao analisarmos a quantidade de exons por transcritos, obtivemos uma média de 3 exons por lncRNA, sendo que aproximadamente 35% dos transcritos possuem 3 exons (Figura 10C e 10D).

Curiosamente, nos RNAs com expressão aumentada verificamos transcritos com até 10 exons e nos RNAs com expressão diminuída com até 7 exons, porém não houve correlação entre tamanho dos transcritos e seu número de exons (Apêndice 3). Em relação a distribuição cromossômica, não foi possível visualizar o mesmo padrão observado nos lncRNAs aumentados (Figura 10E).

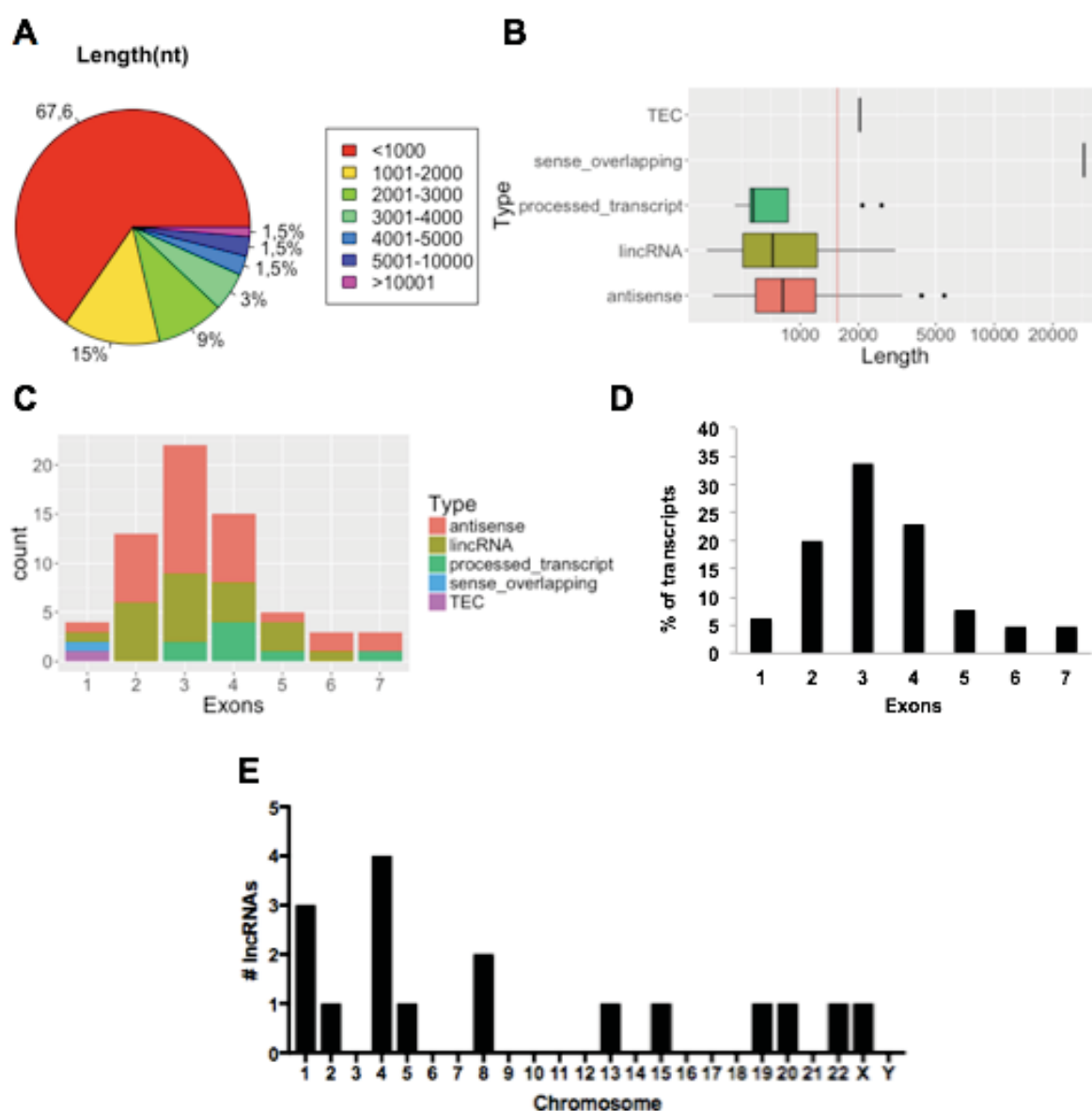


FIGURA 10: Descrição dos lncRNAs diminuídos na fração TOTAL durante a osteogênese (24h) de células-tronco adultas. (A) Visualização da porcentagem de transcritos e seus comprimentos (nt) e, (B) distribuição de tamanho por classe, média determinada por reta vermelha, (C) distribuição dos lncRNAs em suas classes relacionado à quantidade de exons, (D) porcentagem de exons por transcritos e (E) distribuição cromossômica.

4.4.4 – Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração Polissomal

Todas as caracterizações supracitadas, foram realizadas em ambas as diferenciações celulares e frações sequenciadas. Portanto, ao classificarmos os lncRNAs diferencialmente expressos na fração polissomal, notamos que em sua maioria (55,5%), esses transcritos são identificados como RNAs não codificantes intergênicos (*lincRNAs*) (Figura 11).

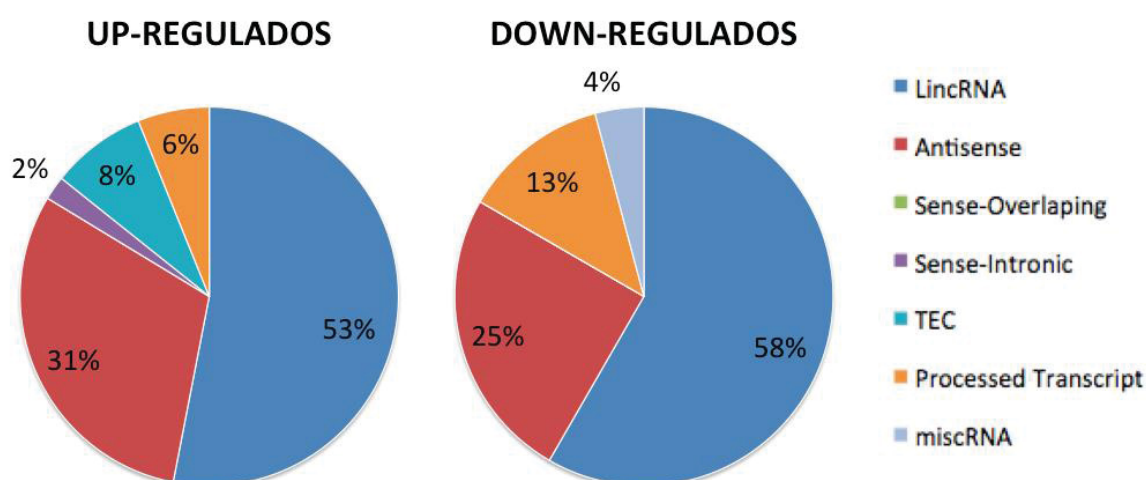


FIGURA 11: Classificação dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração POLISSOMAL da diferenciação osteogênica de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo (24h), divididos em lncRNAs aumentados e diminuídos, respectivamente.

Os 49 lncRNAs aumentados possuem um total de 144 transcritos alternativos (média de 2,9 transcritos por gene), sendo que 63% possuem comprimento entre 200 e 1000 nucleotídeos, com média de 1494 nt (Figura 12A e 12B). Encontramos o menor lncRNA com 239 nt (RP11-736K20.5) e o maior com 22743 nt (NEAT1). Em relação a quantidade de exons por transcrito, verificamos uma média de 3 exons por lncRNA, onde aproximadamente 35% dos transcritos possuem somente 2 exons (Figura 12C e 12D). Igualmente, verificamos a possibilidade de haver correlação entre o número de exons e o tamanho dos transcritos, porém não houve correlação (Apêndice 3). Curiosamente, de forma similar aos lncRNAs aumentados na fração TOTAL, os transcritos aumentados POLISSOMAIS tiveram uma distribuição cromossomal ampla, com exceção dos cromossomos 14, 20, 21, 22 e X (Figura 12E). Destaca-se uma maior quantidade

de lncRNAs do cromossomo 11, tanto dos RNAs expressos na fração total, como nos da fração polissomal.

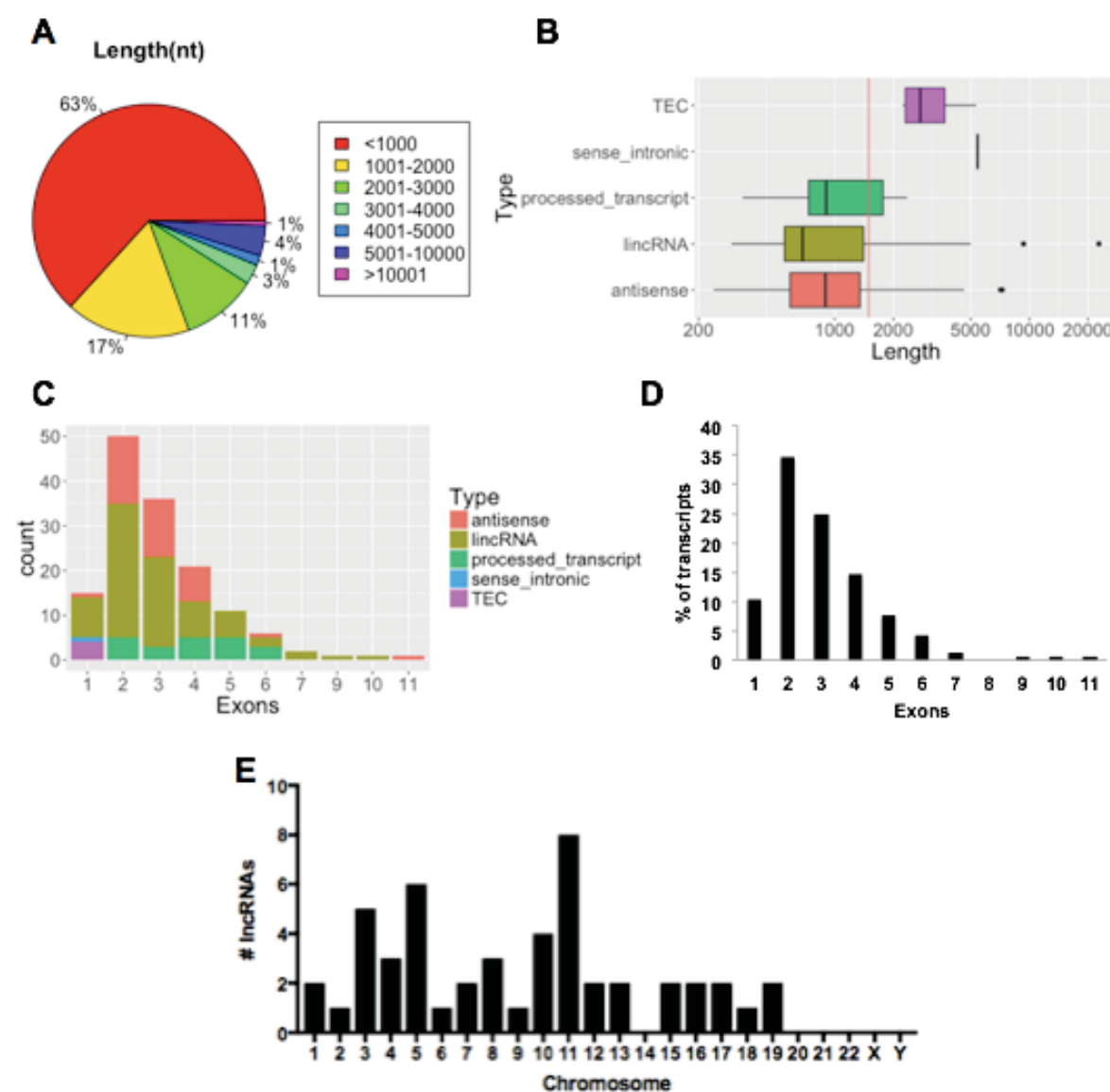


FIGURA 12: Descrição dos lncRNAs aumentados na fração POLISSOMAL durante a osteogênese (24h) de células-tronco adultas. (A) Visualização da porcentagem de transcritos e seus comprimentos (nt) e, (B) distribuição de tamanho por classe, média determinada por reta vermelha, (C) distribuição dos lncRNAs em suas classes relacionado à quantidade de exons e (D) porcentagem de exons por transcritos e (E) distribuição cromossômica.

Os 24 lncRNAs diminuídos possuem 162 transcritos variantes (média de 6,7 transcritos por gene), sendo que 77% possuem comprimento entre 200 e 1000 nucleotídeos, com média de 962 nt (Figura 13A e 13B). O menor RNA possui 240 nucleotídeos de comprimento (SNHG1) e o maior 9658 nt (JPX). A quantidade de

exons por transcrito também foi avaliada, obtendo-se uma média de aproximadamente 5 exons por transcrito (Figura 13C e 13D). E novamente, não foi possível identificar algum padrão relacionado a distribuição cromossômica dos lncRNAs diminuídos (Figura 13E).

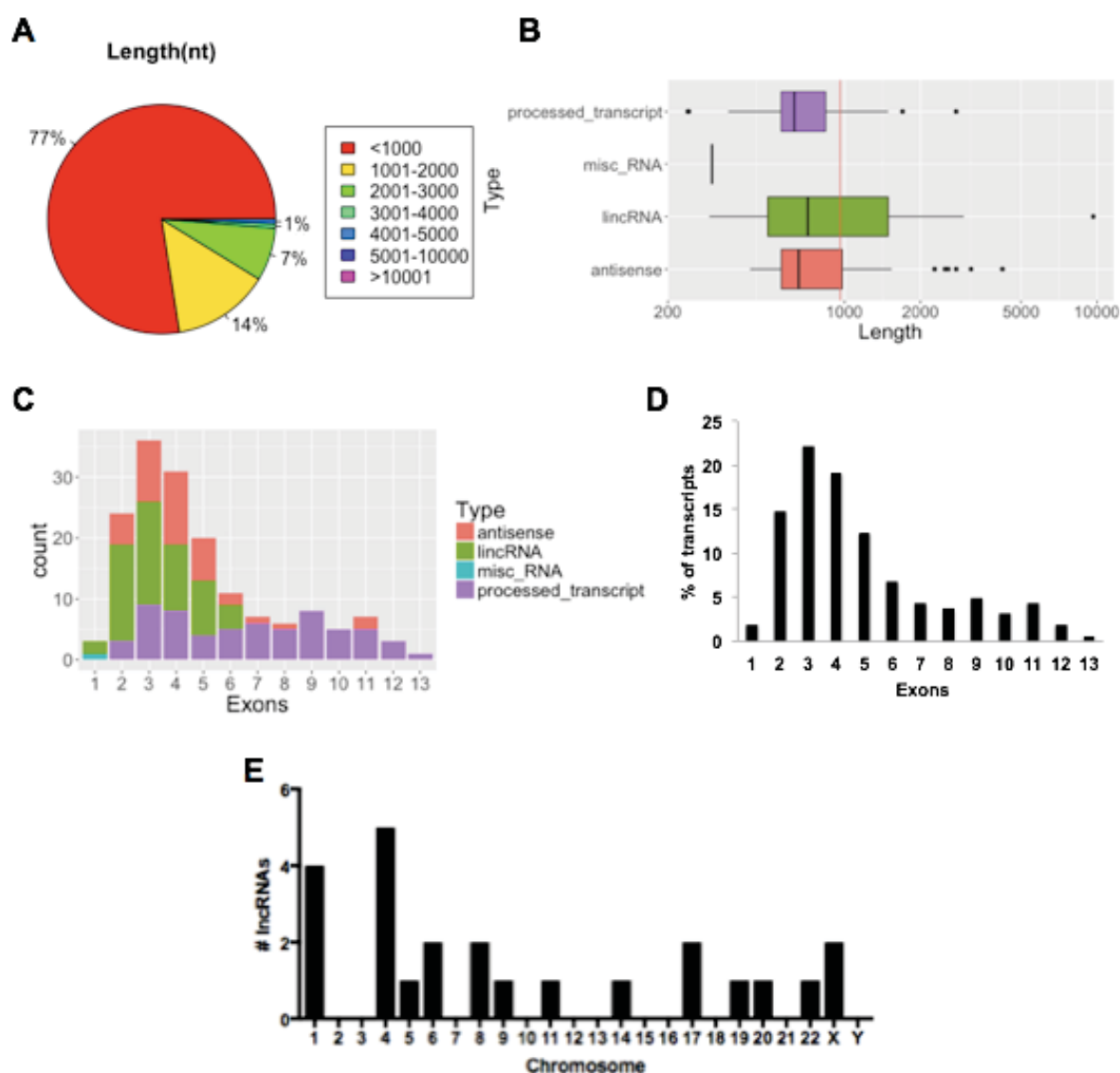


FIGURA 13: Descrição dos lncRNAs diminuídos na fração POLISSOMAL durante a osteogênese (24h) de células-tronco adultas. (A) Visualização da porcentagem de transcritos e seus comprimentos (nt) e, (B) distribuição de tamanho por classe, média determinada por reta vermelha, (C) distribuição dos lncRNAs em suas classes relacionado à quantidade de exons e (D) porcentagem de exons por transcritos e (E) distribuição cromossômica.

4.4.5 – Comparação entre as frações no início da osteogênese

Apesar da dificuldade de se revelar alguns aspectos específicos através dos dados de RNA-seq, como por exemplo, a cinética traducional dos transcritos associados aos ribossomos, algumas análises foram realizadas a fim de melhor compreender e caracterizar esses lncRNAs polissomais. Recentemente, Wang H e colaboradores (2017), através de dados de sequenciamento de *Ribosome Profiling*, caracterizaram e compararam os lncRNAs associados à ribossomos com genes codificadores de proteínas e lncRNAs não associados, sendo visto que os lncRNAs que possuíam ocupação ribossômica apresentavam distinções consideráveis (por exemplo: comprimento, expressão, conservação, número de éxons e conteúdo GC) daqueles não associados e com isso possivelmente funções completamente distintas (WANG H et al. 2017).

Com isso, comparamos os comprimentos dos transcritos encontrados na fração TOTAL e POLISSOMAL dos lncRNAs aumentados (Figura 14A), a sua quantidade de exons (Figura 14B) e o conteúdo GC (Figura 14C). O conteúdo GC dos transcritos pode influenciar diretamente a estabilidade do RNA, assim como seu controle transcricional e de processamento (KUDLA et al. 2006; NIAZI & VALADKHAN 2012). Além disso, o conteúdo GC também estaria relacionado a uma maior permissividade do transcrito à associação aos ribossomos e a sequências codificadoras (PIQUES et al. 2009; HAERTY & PONTING 2015; AMIT et al. 2012; WANG et al 2017). No entanto, não houve significância quando comparamos as frações TOTAL e POLISSOMAL dos lncRNAs aumentados (*Mann-Whitney U test*, *P-value* = 0,7263), sendo um possível viés a análise feita com todos os transcritos e não somente os mapeados (Figura 14C). Igualmente não foi verificada significância quando comparamos as frações em relação a comprimento e quantidade de exons (*Mann-Whitney U test*, *P-value* = 0,61708 e *P-value* = 0,99202, respectivamente) (Figura 14A e 14B).

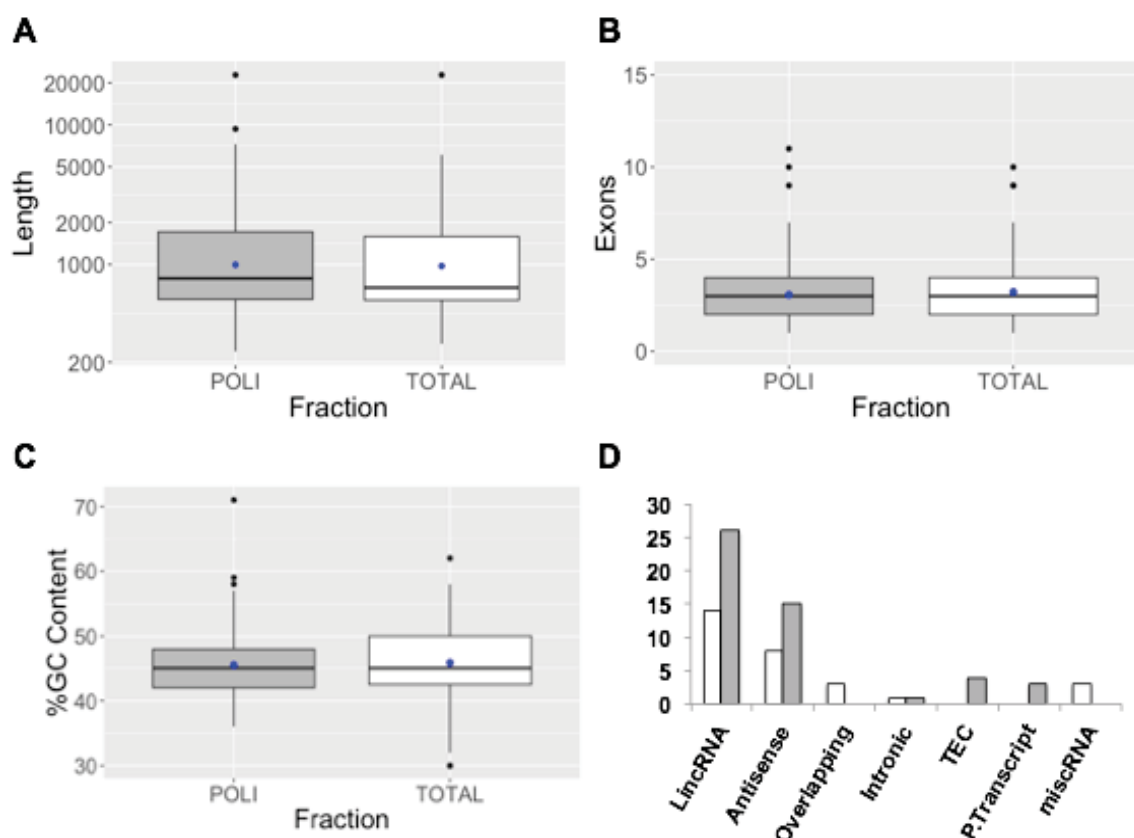


FIGURA 14: Comparação entre as frações TOTAL e POLISSOMAL dos lncRNAs aumentados no início da diferenciação osteogênica (24h). (A) Tamanho dos transcritos em cada fração, (B) quantidade de exons, (C) porcentagem do conteúdo GC dos transcritos e (D) lncRNAs comparados em relação as classes e frações. Representação em cinza da fração POLISSOMAL e em branco da fração TOTAL. Média das frações representada em azul.

As mesmas comparações foram realizadas para os lncRNAs diminuídos, sendo encontrado significância em relação a quantidade de exons dos transcritos da fração polissomal em relação aos da fração total (*Mann-Whitney U test*, *P-value* = 0,00026) (Figura 15B), porém ao comparamos seus tamanhos e conteúdo GC, ambas as frações demonstraram padrão semelhante (*Mann-Whitney U test*, *P-value* = 0,1096 e *P-value* = 0,09692, respectivamente) (Figura 15A e 15C).

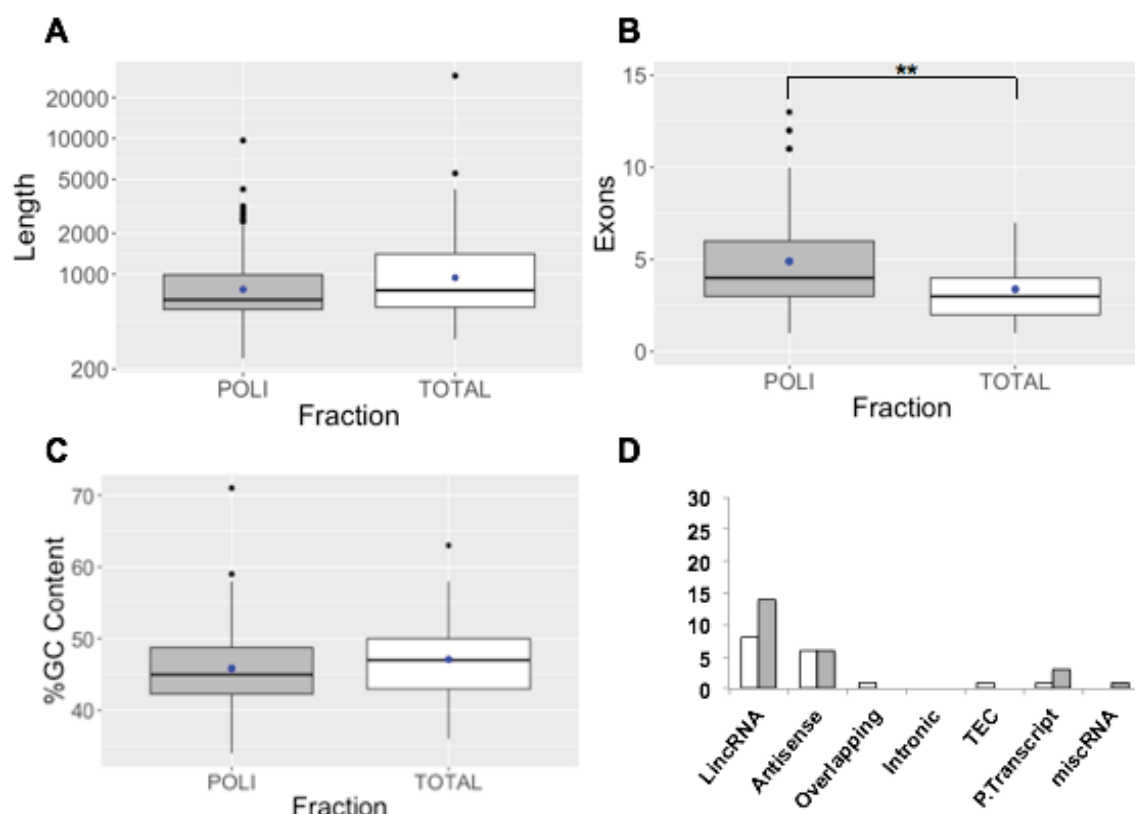


FIGURA 15: Comparação entre as frações TOTAL e POLISSOMAL dos lncRNAs diminuídos no início da diferenciação osteogênica (24h). (A) Tamanho dos transcritos em cada fração, (B) quantidade de exons, (C) porcentagem do conteúdo GC dos transcritos e (D) lncRNAs comparados em relação as classes e frações. Representação em cinza da fração POLISSOMAL e em branco da fração TOTAL. Média da fração representada em azul. ** $p < 0,01$.

Com o intuito de verificar o potencial de estruturação destes RNAs, analisamos os níveis de energia livre mínima (MFE - *minimum free energy*) das sequências para a formação da estrutura secundária. Teoricamente, sequências mais longas, são em média, mais estáveis pois podem realizar mais interações das suas ligações de hidrogênio e empilhamento, além do mais, RNAs com um conteúdo GC maior são tipicamente mais estáveis e a ordem dos nucleotídeos pode influenciar na estabilidade do dobramento da estrutura, pois isto, determina o número e a extensão da conformação dos *loops* e duplas-hélice (SEFFENS & DIGBY 1999, BONNET et al. 2004). Na figura 16A, não se pode notar significância em relação a MFE dos lncRNAs da fração total comparados com os da fração polissomal (*Kolmogorov-Smirnov test*, $P\text{-value} = 0,280$), porém ao compararmos com os mRNAs encontrados na fração polissomal, vemos que estes, possuem um valor significativamente menor que o dos lncRNAs, indicado pela mudança da

curva para a esquerda na distribuição acumulada (*Kolmogorov-Smirnov test*, *P-value* < 0,0001)(Figura 16A).

Além disso, visualizamos a porcentagem de elementos transponíveis (TE, *transposable elements*) nos lncRNAs diferencialmente expressos (Figura 16B; Apêndice 4). Elementos transponíveis são sequências de ácidos nucleicos capazes de serem inseridas no DNA genômico, podendo ter efeitos benéficos ou maléficos para o organismo. São classificados em duas categorias, sendo a Classe II de DNAs transponíveis, os quais necessitam de enzimas chamadas transposases para sua inserção. E a Classe I, composta de RNAs transponíveis, sendo as sequências inseridas através de retrotransposição. Esses retroelementos são subdivididos em elementos LTR (*Long-Terminal Repeat*), por exemplo, retrovírus endógenos (HERVs) e elementos não-LTR, por exemplo, LINE-1 (L1 – Long Interspersed Element-1), SINEs (Short Interspersed Elements), representando os elementos Alu e SVA (SINE-VNTR-Alu) (KINES & BELANCIO 2012). Particularmente, os elementos Alu exônicos são conhecidos por participarem de funções moleculares importantes, como por exemplo, decaimento do transcrito, transcrição, tradução e edição de RNA pela interação com proteínas (BERGER & STRUB 2010; GONG & MAQUAT 2011). Aliás, foi demonstrado que o lncRNA 5S-OT possui uma sequência Alu, a qual confere habilidade a este transcrito de, interagir com a proteína U2AF65, regulando o *splicing* alternativo de um subgrupo de mRNAs via pareamento Alu/Anti-Alu (HU, WANG & SHAN 2016). Com isso, corroborando com outras pesquisas, podemos notar que os lncRNAs possuem uma porcentagem significativamente maior de elementos transponíveis em relação aos mRNAs, o que reflete a fraca relação evolutiva dos lncRNAs e, por sua vez, parece contribuir com a plasticidade e diversidade das funções destes transcritos em organismos complexos (KELLEY & RINN, 2012; KANNAN et al. 2015). Apesar de não haver diferença significativa entre os lncRNAs da fração total e polissomal (*Kolmogorov-Smirnov test*, *P-value* = 0,903), é notável a diferença em relação aos genes codificadores de proteínas da fração polissomal (*Kolmogorov-Smirnov test*, *P-value* < 0,0001).

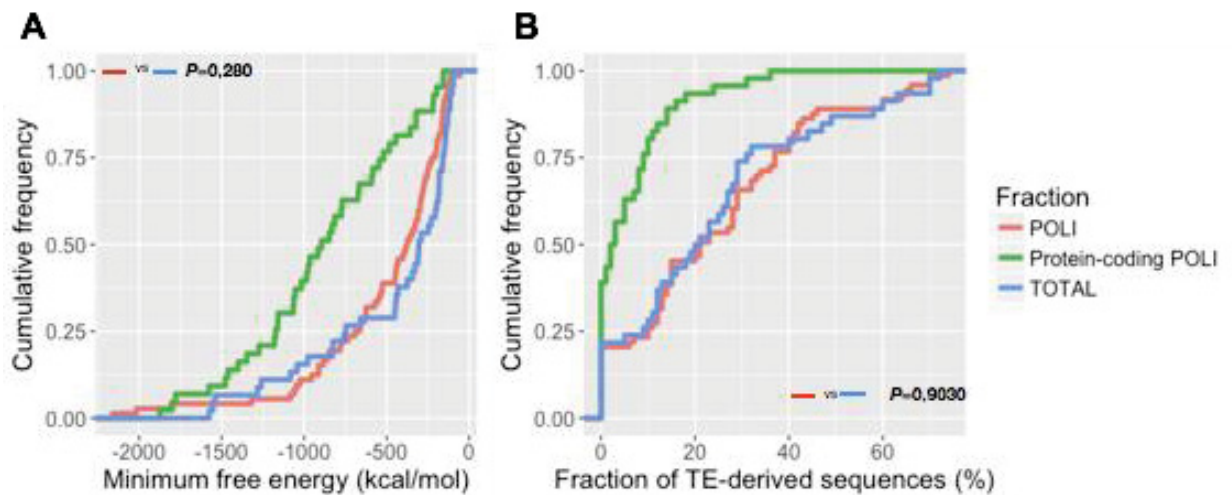


FIGURA 16: Características estruturais dos transcritos no início da diferenciação osteogênica de células-tronco. (A) Distribuição acumulada dos níveis de energia livre mínima dos RNAs (em kcal/mol) e (B) distribuição de sequências derivadas de TE nos exons dos transcritos. Em vermelho, lncRNAs polissomais; Em azul, lncRNAs totais e em verde, mRNAs polissomais.

Curiosamente, quando comparamos os RNAs aumentados e diminuídos das mesmas frações, observou-se que os lncRNAs da fração polissomal aumentados, apresentam significativamente, maiores tamanhos, porém possuem um menor número de exons, enquanto os lncRNAs diminuídos apresentaram características contrárias, sendo de menores tamanhos e com uma quantidade maior de exons (Figura 17A e 17B).

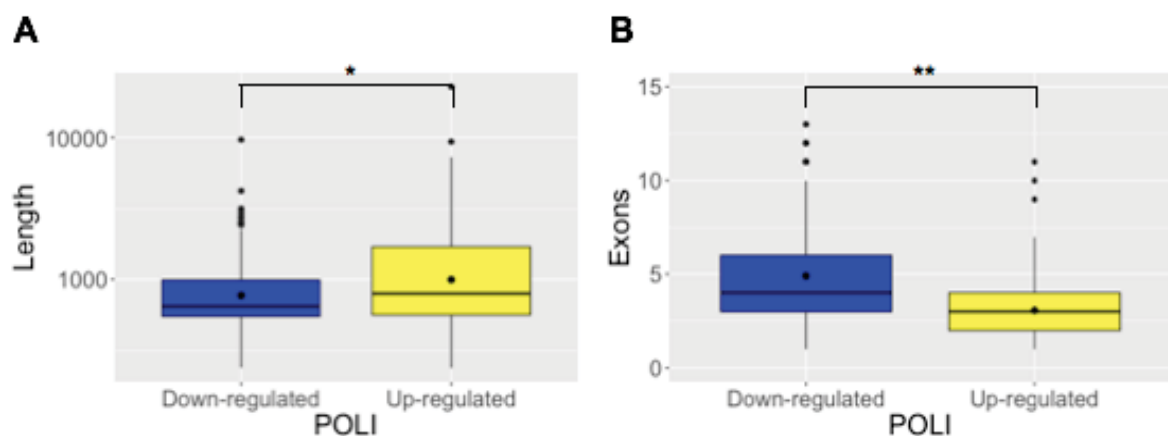


FIGURA 17: lncRNAs aumentados e diminuídos expressos na fração polissomal quando comparados os seus tamanhos (A) e quantidade de exons (B). * $p=0,01$, ** $p<0,01$.

Como dito anteriormente, pouco se compreende a cerca da expressão e função de lncRNAs na diferenciação celular de células-tronco. Nenhum dos

lncRNAs aumentados exclusivos na fração TOTAL (Apêndice 8.1) possui referência no banco de dados de artigos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), onde apenas 4 genes comuns entre as frações e 5 somente expressos na fração POLISSOMAL possuem ao menos uma referência. São eles: **LINC01554**, um possível biomarcador de predição de sobrevivência em câncer de esôfago (FAN & LIU, 2016), **LINC00968**, outro biomarcador de câncer de células pequenas do pulmão (Wang et al. 2017), **LINC00312**, o qual exerce papel na proliferação, migração e apoptose de diferentes tipos tumorais (ZHU et al. 2017), **CASC7**, o qual demonstrou possuir efeitos na proliferação e migração de células de câncer de colón (Zhang et al. 2017), **EMX2OS**, importante na regulação pós-transcricional do gene Emx2 durante o desenvolvimento do sistema neural murino (SPIGONI, GEDRESSI & MALLACAMACI, 2010), **TP53TG1**, o qual possui a capacidade de interagir e bloquear a atividade nuclear da proteína de ligação à RNA YBX1, que por sua vez tem como uma de suas funções a repressão da transcrição gênica de COL1A1 (Colágeno Tipo A1) (DIAZ-LAGARES et al. 2016; NORMAN et al. 2001). Sendo que, COL1A1 é um dos marcadores da diferenciação osteogênica, sendo a maior proteína de matriz produzida por osteoblastos (WESTHRIN et al. 2015), **NEAT1**, **H19** e curiosamente o lncRNA **DANCR** (discutidos previamente na sessão 1.4.1).

Para os lncRNAs diminuídos, apenas 2 transcritos comuns e 6 somente expressos na fração polissomal possuem ao menos uma referência: **JPX**, um lncRNA ativador de XIST durante a inativação do cromossomo X (TIAN, SUN & LEE, 2010), **SNHG1**, superexpresso em células de osteosarcoma, regulando sua proliferação, migração e transição epitélio-mesenquimal (JIANG, JIANG & FANG, 2018) **SNHG8**, um possível biomarcador da tumorigênese gástrica (HUANG et al. 2016), **ZFAS1**, que parece agir como um RNA de competição endógena (ceRNA) interagindo e regulando a ação dos microRNAs miR-484, miR-486, miR-150, miR-27a, miR-200 (XIA et al. 2017; XIE et al. 2017; LI et al. 2017), **LINC01133**, que possui atividade de aumentar a proliferação, migração e invasão de osteosarcoma, possivelmente através da interação e inibição de miR-442 (ZENG, QIU & FENG, 2017), **MIR503HG**, superexpresso na placenta e hipóxia-depente (FIEDLER et al. 2015; MUYS et al. 2016), **GAS5**, documentado em diversos sistemas, incluindo câncer e sistema cardiovascular, sendo que este lncRNA parece ser suprimido pelo miR-196a, causando assim, a diminuição de sua

expressão (WANG et al. 2018). De forma interessante, Kim e colaboradores comprovaram que a superexpressão de miR-196a causou a diminuição da proliferação e aumento da diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo (KIM et al. 2009); e **VLDLR-AS1** (comentado na sessão 4.7). Curiosamente, Karlsson e colaboradores investigaram a expressão de lncRNAs em vesículas extracelulares advindas de leite materno humano e verificaram uma alta correlação entre a expressão de SNHG8, ZFAS1 e GAS5, o que poderia indicar que a ativação/inativação da expressão destes lncRNAs é regulada pela mesma via (KARLSSON et al. 2016). Em nossos dados aqui demonstrados, podemos ver que estes três transcritos estão down-regulados durante o início da diferenciação osteogênica (Apêndice 7.2).

4.5 – Adipogênese

Igualmente às análises realizadas para a diferenciação osteogênica, também foram feitas para a diferenciação adipogênica (24h) de células-tronco derivadas de tecido adiposo. Para isso, os mesmos critérios foram utilizados para todas as análises.

Portanto, observamos que na fração TOTAL e POLISSOMAL, cerca de 79% dos genes sequenciados são codificadores de proteínas (mRNAs) em ambas as frações, sendo que dos 21% de genes não codificantes, 7% e 5% são lncRNAs, respectivamente (Figura 18).

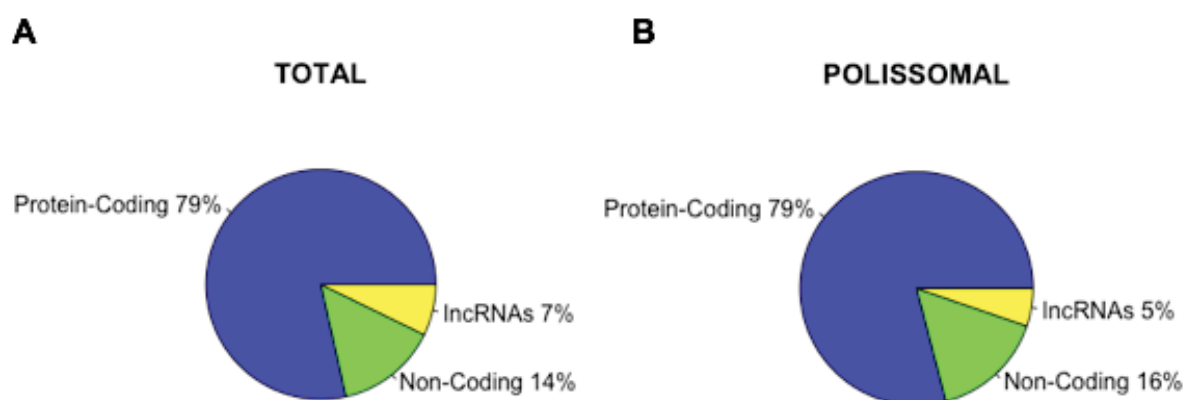


FIGURA 18: Porcentagem de genes identificados no RNA-seq nas frações TOTAL (A) e POLISSOMAL (B) de células-tronco induzidas a diferenciação adipogênica (24h).

Observou-se a expressão de 1100 lncRNAs na fração TOTAL, sendo em sua maioria de transcritos *Antisense*. Já em relação a fração POLISSOMAL, 782 lncRNAs foram identificados, sendo em sua maioria de *lincRNAs* (Figura 19), demonstrando assim um padrão similar de expressão aos lncRNAs da diferenciação osteogênica.

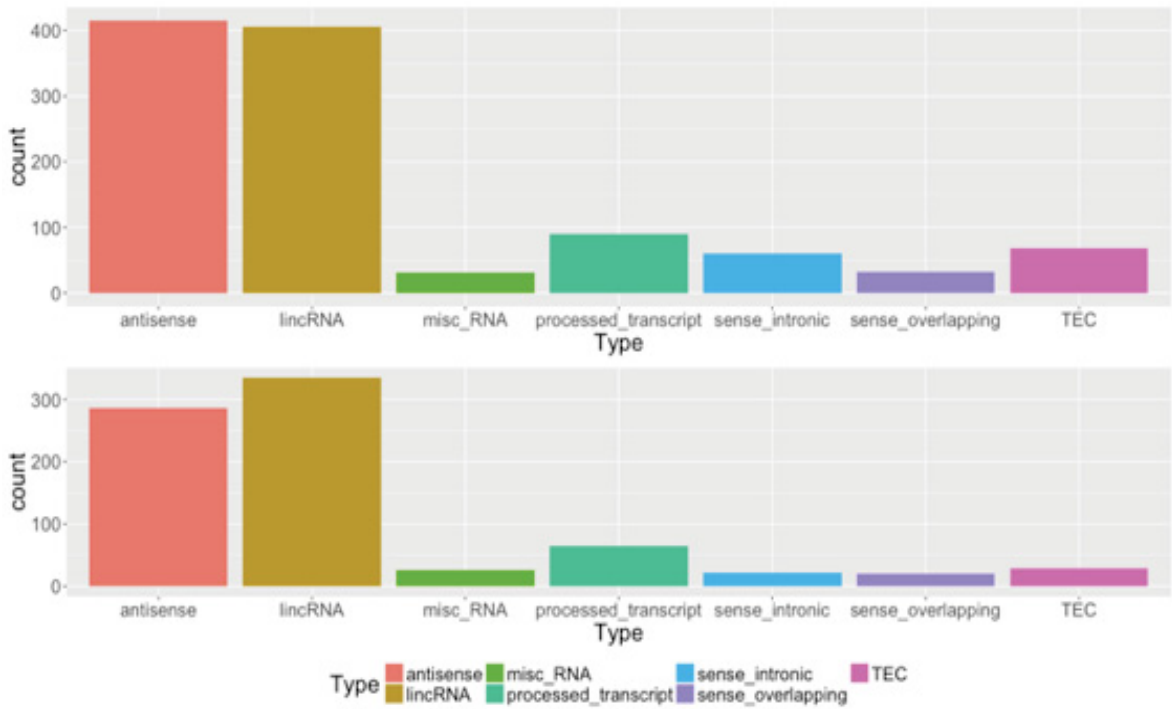


FIGURA 19: Distribuição dos lncRNAs de acordo com sua classificação e nomenclatura. (A) lncRNAs expressos na fração TOTAL e lncRNAs expressos na fração POLISSOMAL (B).

4.5.1 – Expressão diferencial de lncRNAs no início da adipogênese (24h)

Em relação a fração TOTAL das células induzidas a diferenciação adipogênica, foi verificado um total de 76 lncRNAs diferencialmente expressos, ou seja, 6,9% dos 1100 lncRNAs identificados no sequenciamento. Porém, ao compararmos somente os DEGs relacionados aos genes não codificantes, os lncRNAs representam 60,3% de DEGs desta classe (Quadro 7). Sendo que, 57 lncRNAs estão aumentados e 19 diminuídos (Apêndice 9).

QUADRO 7 – Expressão de genes totais e diferencialmente expressos

TIPO	TOTAL	DEGs
------	-------	------

Non-coding	2175	126
lncRNAs	1100	76

Já na fração POLISSOMAL da adipogênese, constatamos 89 transcritos diferencialmente expressos (Quadro 8), o que representa 11,4% dos lncRNAs sequenciados nesta fração. Sendo que, ao avaliarmos somente os DEGs não codificantes, os 89 lncRNAs equivalem a um total de aproximadamente 55% destes genes (Apêndice 10). Dos 89 transcritos, 46 lncRNAs se encontram aumentados e 43 diminuídos.

QUADRO 8 – Expressão de genes polissomais e diferencialmente expressos

TIPO	POLI	DEGs
Non-coding	2339	162
lncRNAs	782	89

Ao compararmos as frações TOTAL e POLISSOMAL, verificamos que, de forma similar a osteogênese, tivemos padrões distintos de expressão entre as frações, havendo poucos elementos comuns (Figura 20). Os lncRNAs compartilhados entre as frações representam apenas 21% dos transcritos aumentados e 25% dos transcritos diminuídos.

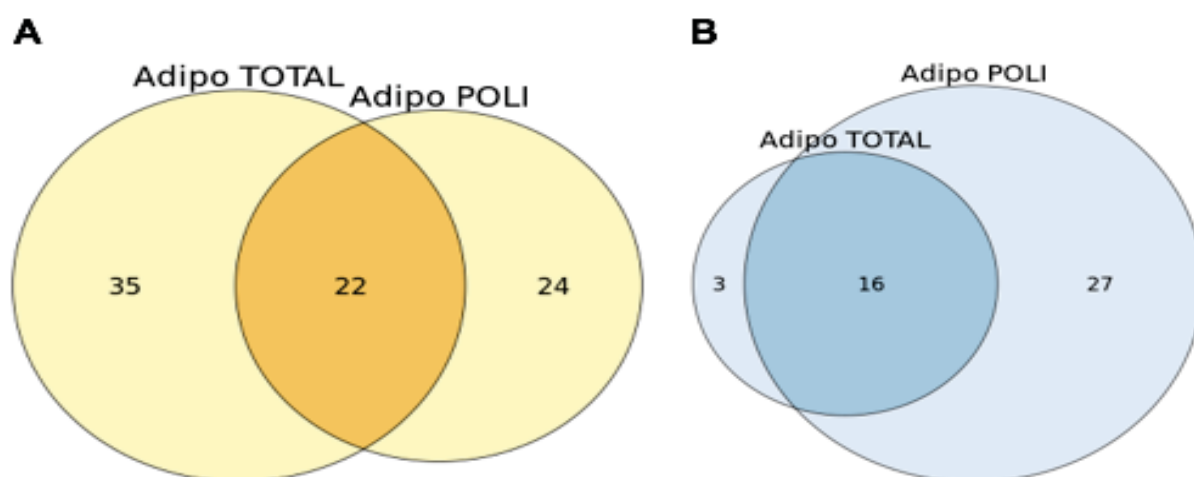


FIGURA 20: Diagrama de Euler relacionando os lncRNAs diferencialmente expressos aumentados (A) e diminuídos (B) na fração TOTAL e POLISSOMAL da adipogênese.

Algo que chama a atenção, é a grande quantidade de transcritos associados a maquinaria traducional, o que denota um possível mecanismo de regulação pós-transcricional e traducional que na maioria das vezes não pode ser observado em ensaios de transcriptômica tradicionais. Por exemplo, Yonn et al. demonstrou que o lncRNA-p21, o qual é um lncRNA associado a ribossomos, seletivamente reprime a tradução dos mRNAs JUNB e CTNNB1 (YONN et al. 2012). Além disso, Essers et al. (2015) demonstraram a expressão do lncRNA tts-1 associado a maquinaria traducional de *C.elegans* mutantes. Ao depletar tts-1, houve um aumento dramático dos níveis de ribossomos o que ocasionou a redução da sobrevivência destes nematódeos.

4.5.2 – Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração Total

Visualizou-se que, 55% dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração total da adipogênese é de RNAs intergênicos (*lincRNAs*) (Figura 21).

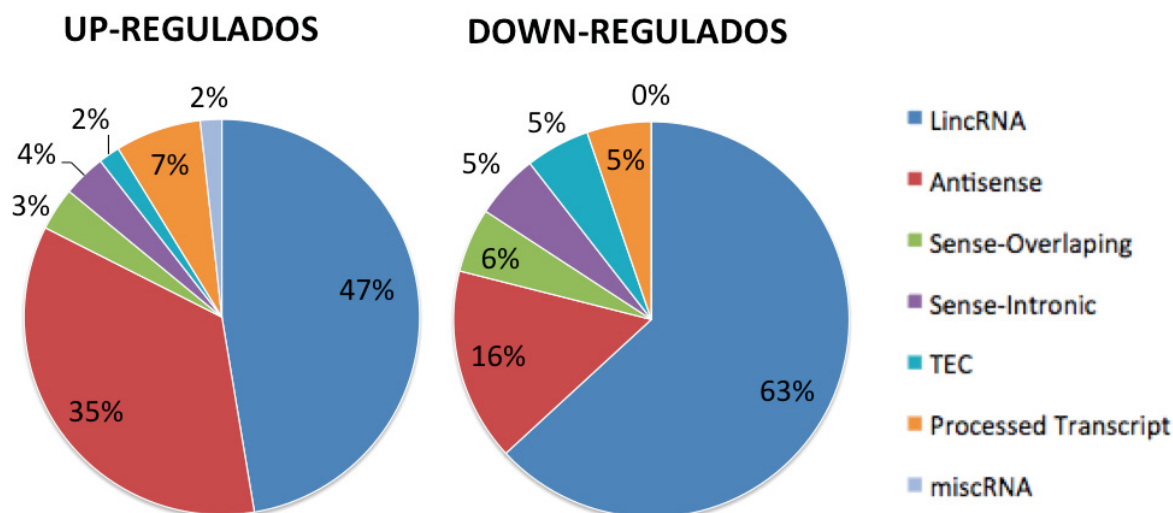


GRÁFICO 21: Classificação dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração TOTAL da diferenciação adipogênica de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo (24h), divididos entre genes aumentados e diminuídos, respectivamente.

Os 57 genes com expressão aumentada possuem um total de 171 transcritos variantes (média de 3 transcritos alternativos por gene), enquanto que os genes diminuídos possuem um total de 64 variantes (média de 3,3 transcritos

alternativos por gene). Ao analisarmos a distribuição por comprimento destes transcritos up-regulados, 67,2% apresentam tamanhos inferiores a 1000 nucleotídeos, sendo a média de comprimento de 1445 nt (Figura 22A e 22B). Curiosamente, o menor transcrito, possui 131 nucleotídeos (ENSG00000230695) e o maior o lncRNA NEAT1 com 22743 nt. Quando avaliamos a quantidade de exons por transcritos, verificamos uma média de 2,8 exons por lncRNA, sendo que a maioria destes RNAs (30%) possuem 2 exons (Figura 22C e 22D). Igualmente a diferenciação osteogênica, podemos visualizar uma ampla distribuição cromossômica dos transcritos, com exceção dos cromossomos 3 e 21 (Figura 22E).

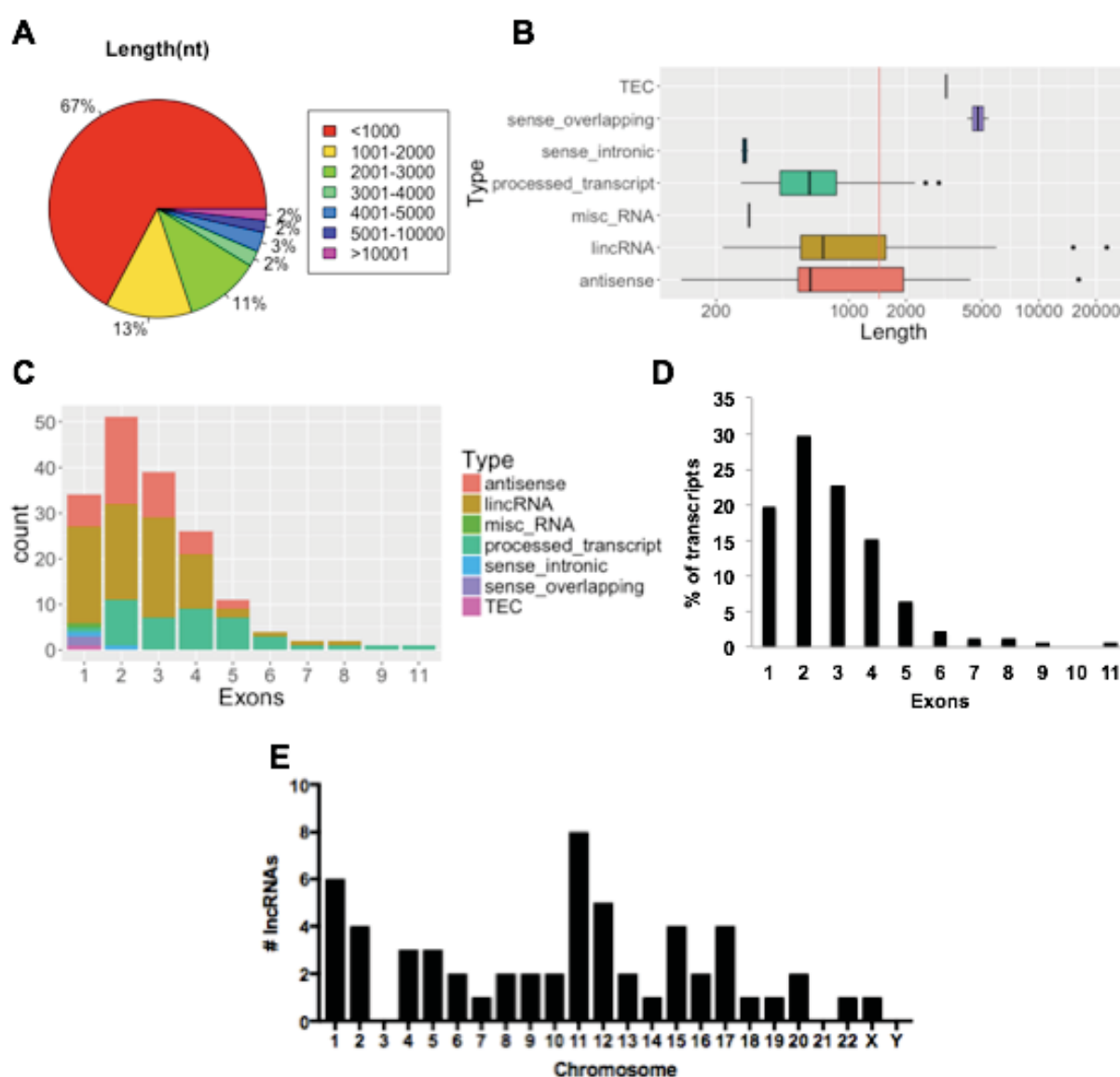


FIGURA 22: Descrição dos lncRNAs aumentados na fração TOTAL durante a adipogênica (24h) de células-tronco adultas. (A) Visualização da porcentagem de transcritos e seus comprimentos (nt) e, (B) distribuição de tamanho por classe, média do tamanho determinada pela reta vermelha, (C) distribuição dos lncRNAs em suas classes relacionado à quantidade de exons, (D) porcentagem de exons por transcritos e (E) distribuição cromossômica.

Dos lncRNAs diminuídos, 64% possuem comprimento entre 200 e 1000 nucleotídeos, sendo a média de comprimento de 1669 nt (Figura 23A e 23B). O menor lncRNA encontrado foi o LINC00856 com 292 nt e, o maior o RP1-309I22.2 com 28929 nt. A média de exons por transcritos foi ligeiramente maior do que a dos genes aumentados (2,96 exons/transcrito), sendo que aproximadamente 33% possuem 2 exons (Figura 23C e 23D). E aparentemente, a distribuição cromossômica destes lncRNAs é aleatória (Figura 23E).

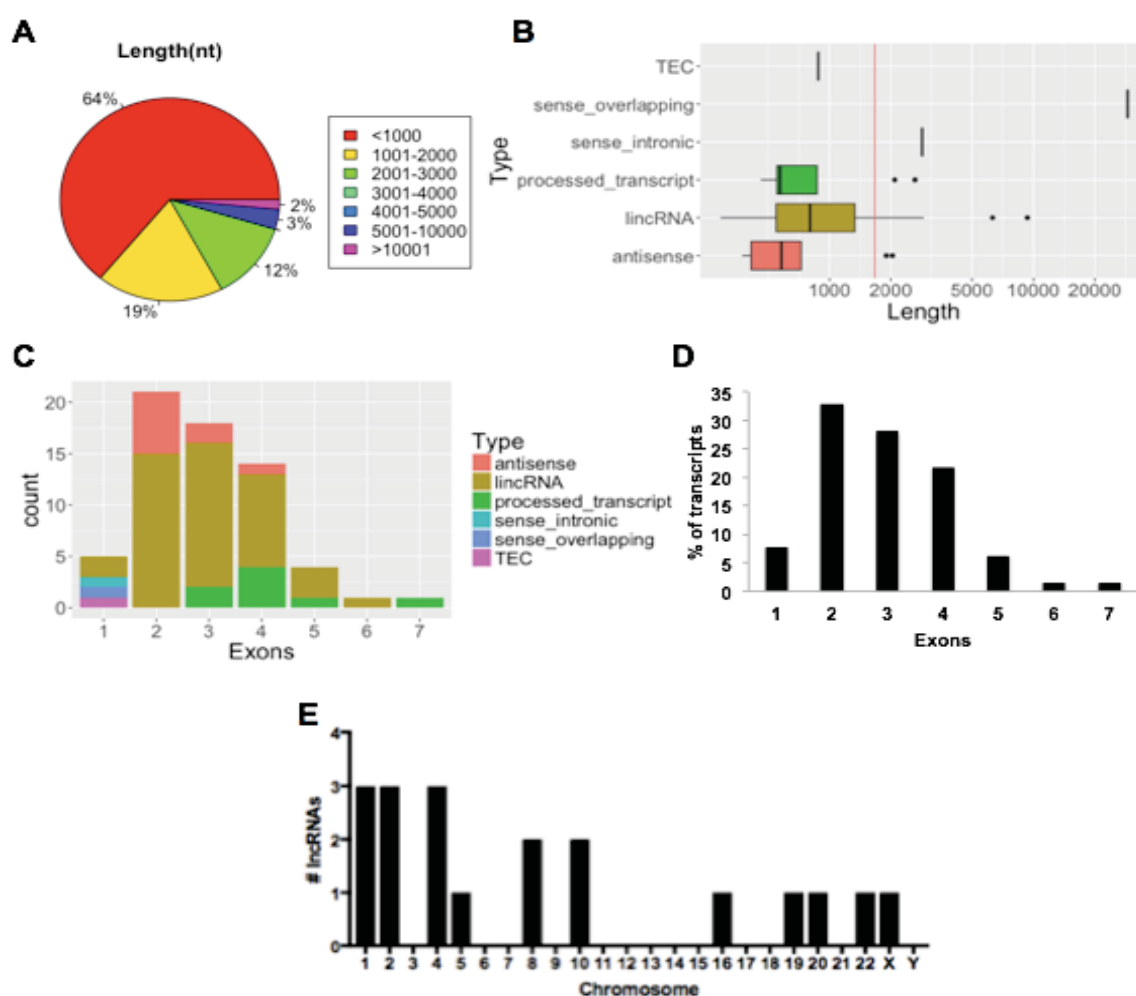


FIGURA 23: Descrição dos lncRNAs diminuídos na fração TOTAL durante a adipogênese (24h) de células-tronco adultas. (A) Visualização da porcentagem de transcritos e seus comprimentos (nt) e,

(B) distribuição de tamanho por classe, média determinada por reta vermelha, (C) distribuição dos lncRNAs em suas classes relacionado à quantidade de exons, (D) porcentagem de exons por transcritos e (E) distribuição cromossômica.

4.5.3 – Caracterização dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração Polissomal

Os lncRNAs diferencialmente expressos na fração polissomal durante o início da diferenciação adipogênica, são classificados em sua maioria como *lincRNAs* (53%) e *antisense* (33,5%) (Figura 24).

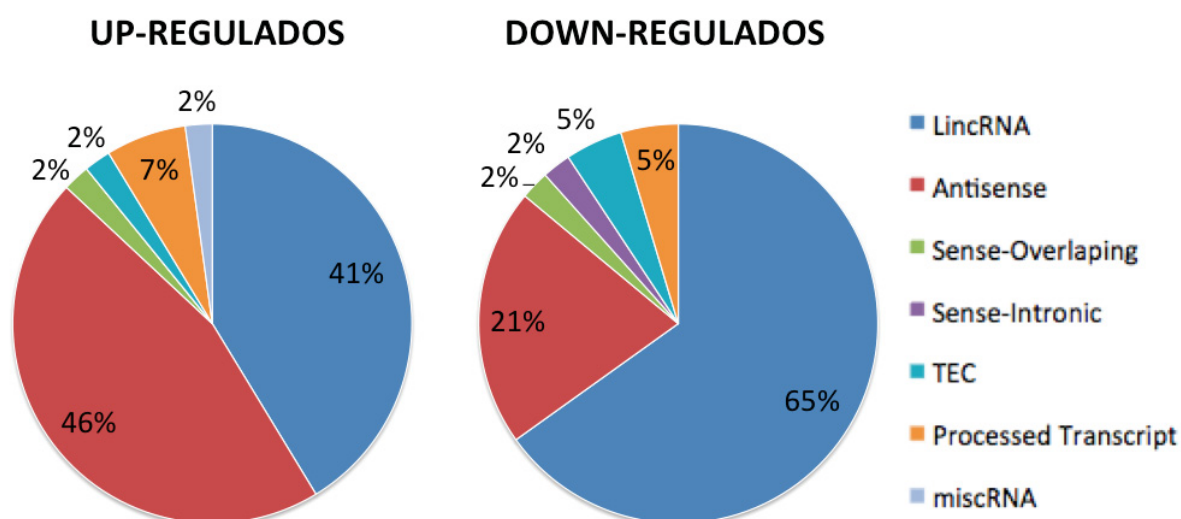


FIGURA 24: Classificação dos lncRNAs diferencialmente expressos na fração POLISSOMAL da diferenciação adipogênica de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo (24h), sendo divididos em lncRNAs aumentados e diminuídos, respectivamente.

Os 46 lncRNAs positivamente expressos possuem um total de 169 transcritos alternativos/variantes (média de 3,7 transcritos por gene), sendo que 72% possuem comprimento entre 200 e 1000 nucleotídeos, com média de 1145 nt. O menor lncRNA encontrado foi o SNORD3D com 217 nt e o maior com 16182 nt (GABPB1-AS1) (Figura 25A e 25B). Em relação a quantidade de exons por transcritos, a média foi de 3,1 exons, onde aproximadamente 34% dos transcritos possuem 2 exons (Figura 25C e 25D). Apenas os cromossomos 10, 13, 16, 20 e X não apresentaram a presença de lncRNAs diferencialmente expressos (Figura 25E).

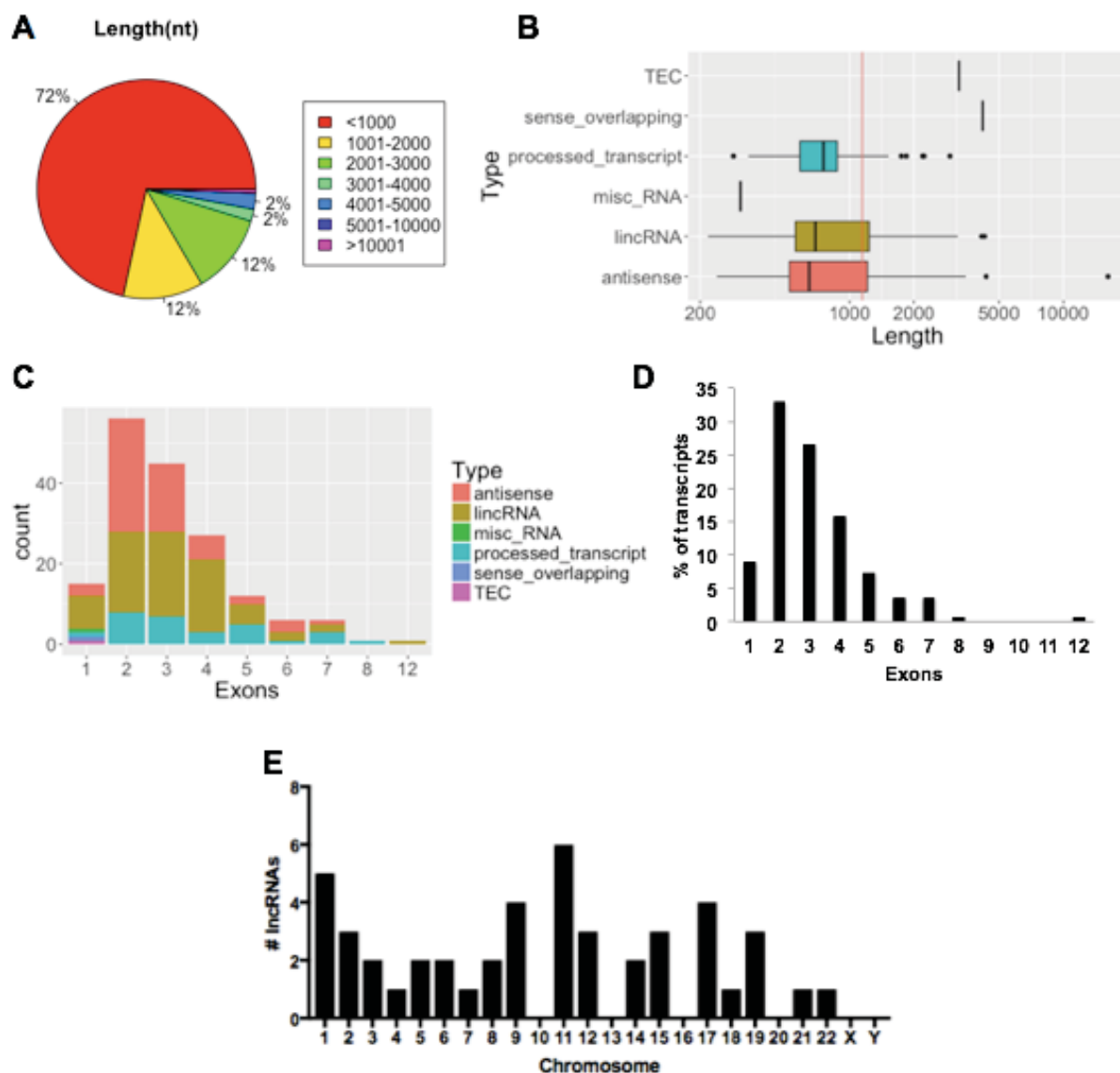


FIGURA 25: Descrição dos lncRNAs aumentados na fração POLISSOMAL durante a adipogênese (24h) de células-tronco adultas. (A) Visualização da porcentagem de transcritos e seus comprimentos (nt) e, (B) distribuição de tamanho por classe, média determinada por reta vermelha, (C) distribuição dos lncRNAs em suas classes relacionado à quantidade de exons e (D) porcentagem de exons por transcritos e (E) distribuição cromossômica.

Já em relação aos lncRNAs negativamente expressos, os 43 lncRNAs possuem um total de 163 transcritos variantes (média de 3,8 transcritos por gene), sendo que aproximadamente 67% possuem comprimento entre 200 e 1000 nucleotídeos, com média de 1335 nt (Figura 26A e 26B). O menor RNA possui 199 nucleotídeos de tamanho (RP11-150O12.1) e o maior 28929 nt (RP1-309I22.2). A quantidade de exons por transcrito também foi avaliada, obtendo-se uma média

de aproximadamente 3,2 exons por transcrito (Figura 26C e 26D). E, podemos verificar uma maior amplitude na distribuição cromossômica destes transcritos down-regulados na adipogênese (Figura 26E).

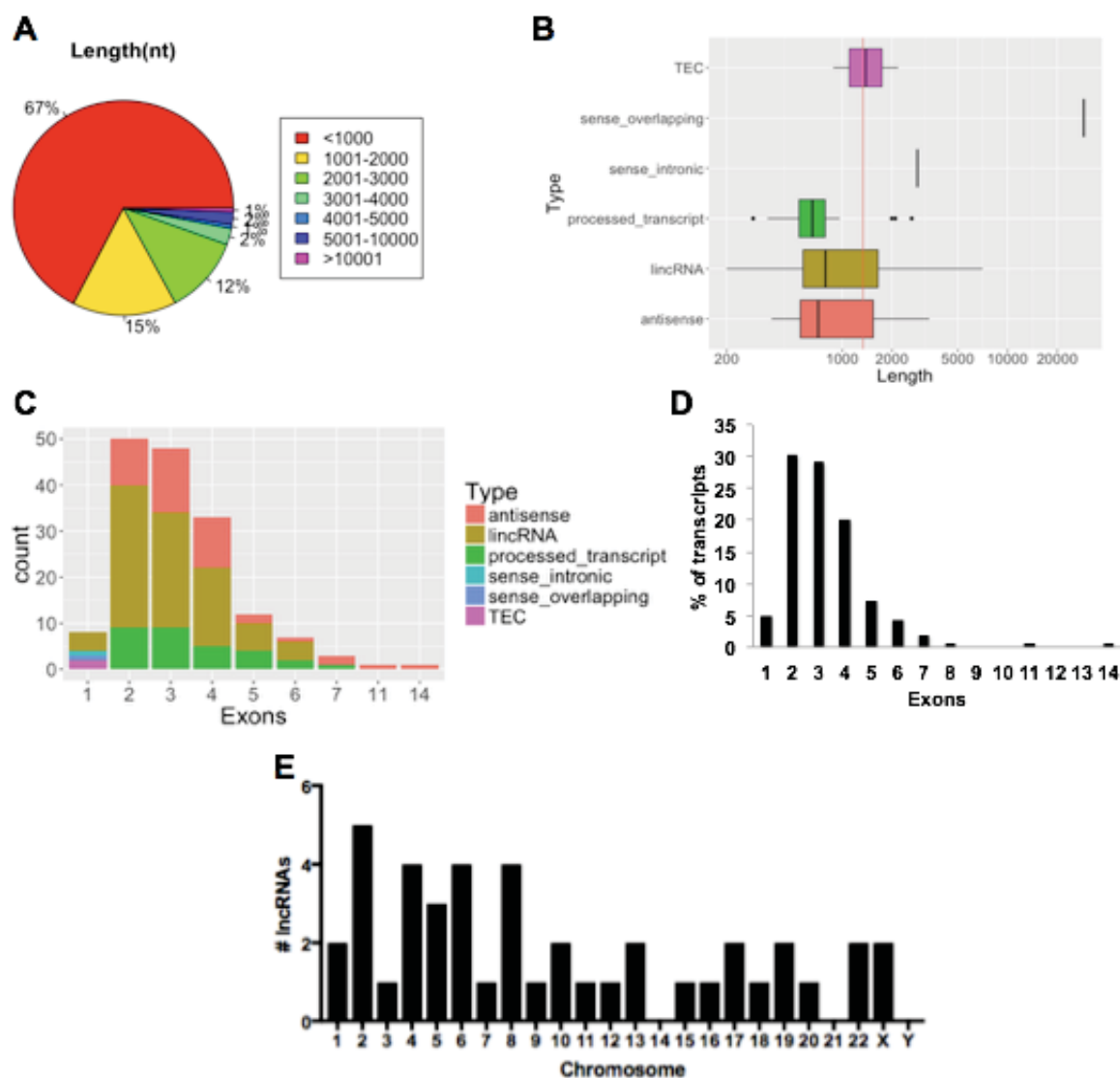


FIGURA 26: Descrição dos lncRNAs diminuídos na fração POLISSOMAL durante a adipogênese (24h) de células-tronco adultas. (A) Visualização da porcentagem de transcritos e seus comprimentos (nt) e, (B) distribuição de tamanho por classe, média determinada por reta vermelha, (C) distribuição dos lncRNAs em suas classes relacionado à quantidade de exons e (D) porcentagem de exons por transcritos e (E) distribuição cromossômica.

4.5.4 – Comparação entre as frações no início da adipogênese

Ao compararmos os lncRNAs aumentados nas duas frações, não houveram diferenças significativas em relação ao comprimento e quantidade de exons dos transcritos (Figura 27A e 27B). Entretanto, constatamos uma diferença ligeiramente significativa em relação à porcentagem de conteúdo GC exônico dos transcritos da fração polissomal em relação a total (Mann-Whitney U test, P -value $<0,05$)(Figura 27C).

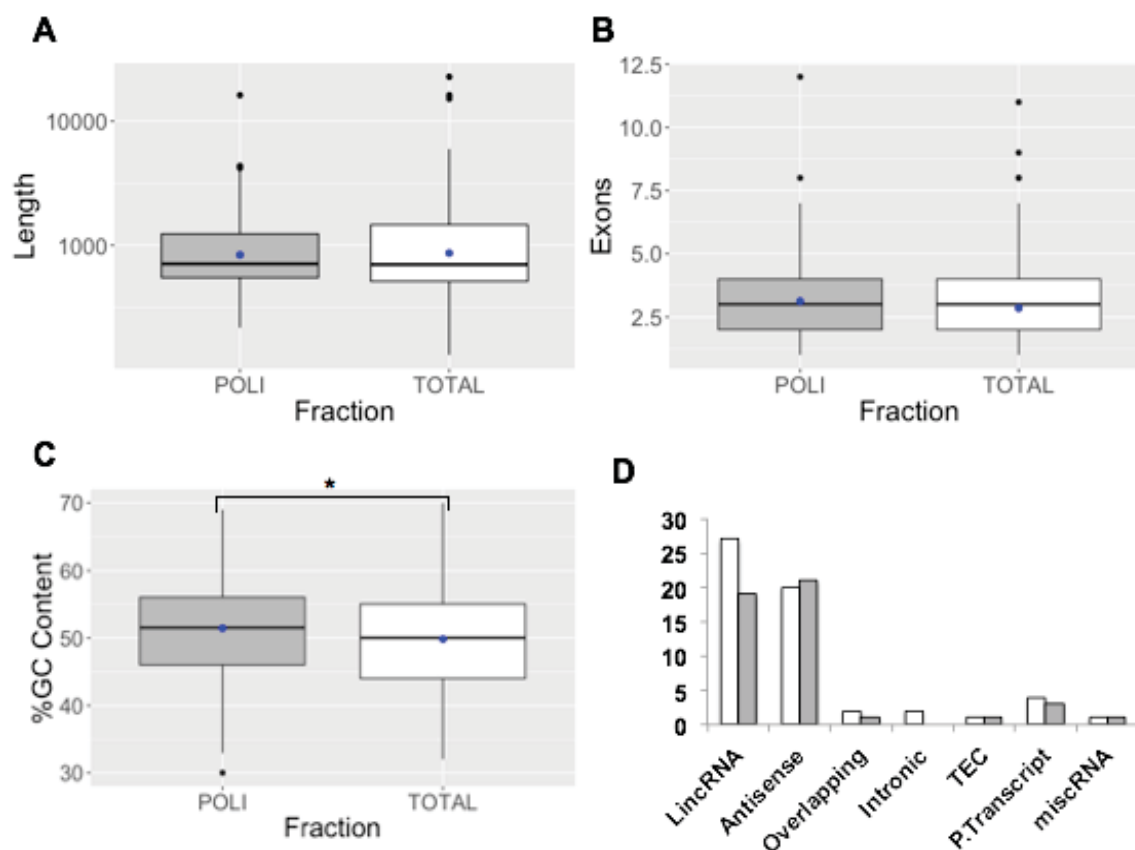


FIGURA 27: Comparação entre as frações TOTAL e POLISSOMAL dos lncRNAs aumentados no início da diferenciação adipogênica (24h). (A) Comprimento dos transcritos em cada fração, (B) quantidade de exons, (C) porcentagem do conteúdo GC dos transcritos e (D) lncRNAs comparados em relação as classes e frações. Representação em cinza da fração POLISSOMAL e em branco da fração TOTAL. Média das frações representada em azul. * $p<0,05$.

Para os transcritos diminuídos, observou-se um padrão semelhante em ambas as frações, não havendo diferenças significativas nos seus tamanhos, quantidade de exons por transcrito e conteúdo GC (Figura 28).

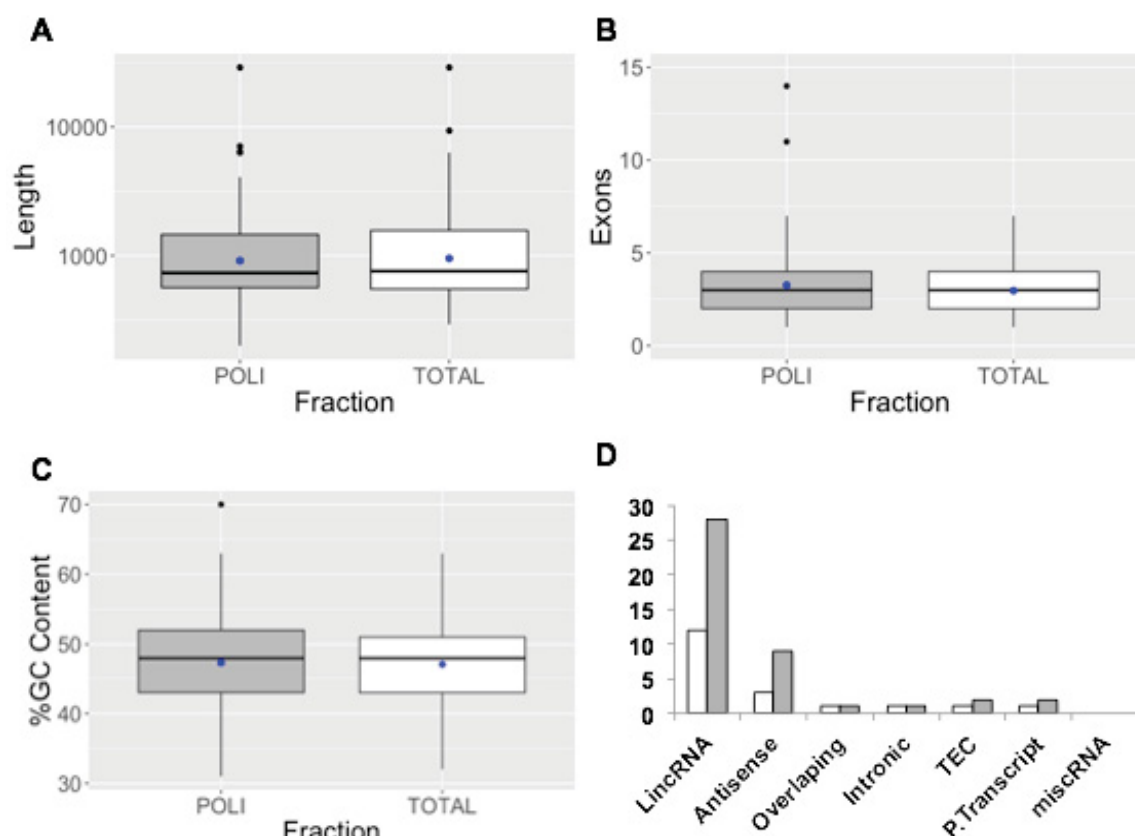


FIGURA 28: Comparação entre as frações TOTAL e POLISSOMAL dos lncRNAs diminuídos no início da diferenciação adipogênica (24h). (A) Comprimento dos transcritos em cada fração, (B) quantidade de exons, (C) porcentagem do conteúdo GC dos transcritos e (D) lncRNAs comparados em relação as classes e frações. Representação em cinza da fração POLISSOMAL e em branco da fração TOTAL. Média da fração representada em azul.

A energia mínima livre requerida para a formação da estrutura secundária foi avaliada nos lncRNAs e mRNAs expressos durante o início da adipogênese e não houve diferença significativa quando os lncRNAs da fração total e polissomal foram comparados (*Kolmogorov-Smirnov test*, $P\text{-value} = 0,895$), porém novamente, quando os lncRNAs foram comparados com os mRNAs da fração polissomal a diferença foi consideravelmente significativa (*Kolmogorov-Smirnov test*, $P\text{-value} < 0,0001$) (Figura 29A).

Como realizado com os genes expressos durante o início da osteogênese, ao analisarmos os elementos transponíveis (TE), notou-se uma diferença significativa quando comparamos os genes codificadores de proteínas da fração polissomal com os lncRNAs diferencialmente expressos durante a adipogênese (*Kolmogorov-Smirnov test*, $P\text{-value} < 0,0001$). Porém, não houve diferença,

quando os lncRNAs da fração total e polissomal foram comparados (*Kolmogorov-Smirnov test*, $P\text{-value} = 0,911$) (Figura 29B).

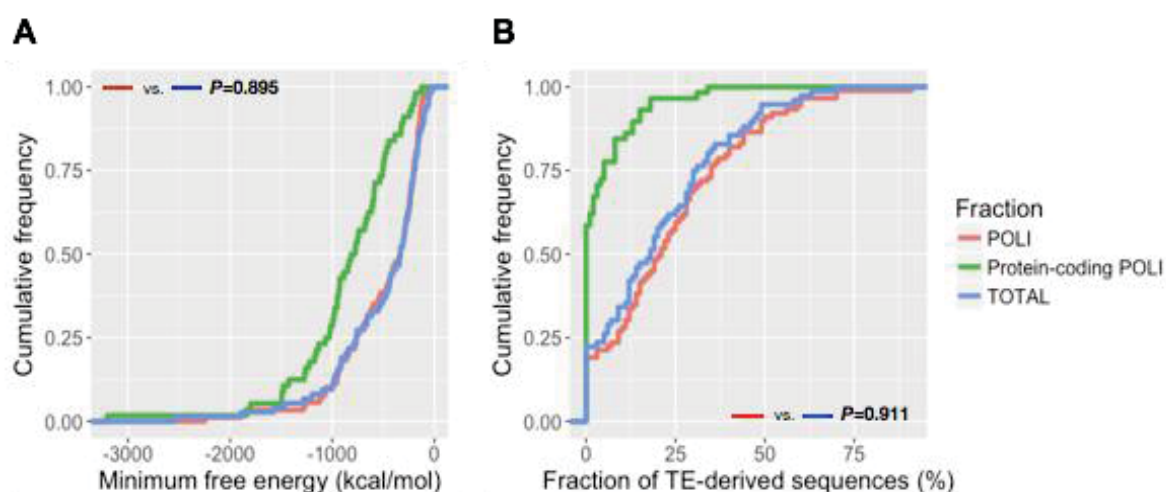


FIGURA 29: Características dos transcritos no início da diferenciação adipogênica. (B) Distribuição cumulativa dos níveis de energia livre mínima dos RNAs, e distribuição de sequências derivadas de TE nos exons dos transcritos.

Ao analisarmos as condições dos lncRNAs aumentados e diminuídos na fração TOTAL e POLISSOMAL, constatou-se que os lncRNAs aumentados nas primeiras 24h da diferenciação adipogênica, possuem um conteúdo GC significativamente maior do que os lncRNAs down-regulados (Figura 30A e 30B).

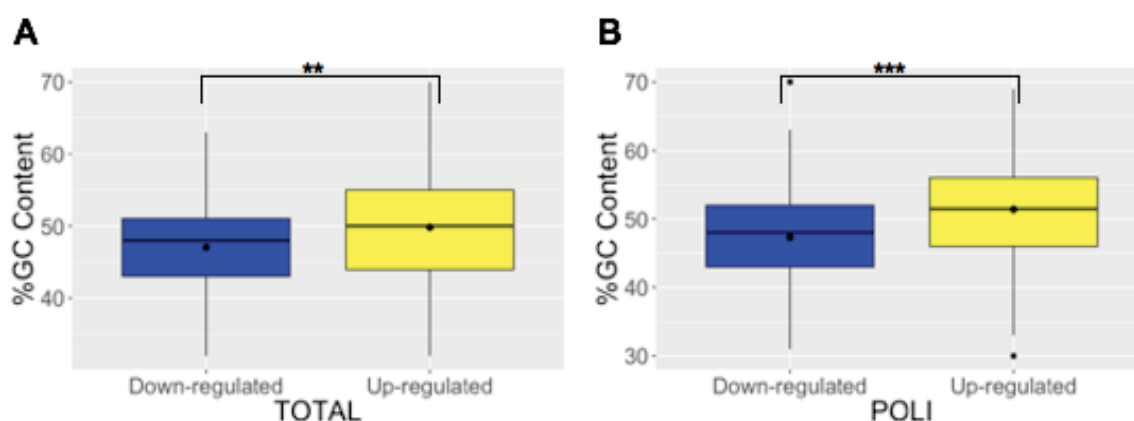


FIGURA 30: LncRNAs aumentados e diminuídos expressos na fração TOTAL (A) e POLISSOMAL (B) quando comparados o seu conteúdo exônico GC (%). Em azul os lncRNAs down-regulados e em amarelo os lncRNAs up-regulados. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dos lncRNAs diferencialmente expressos positivamente durante o início da adipogênese, encontramos ao menos uma referência no banco de artigos do

NCBI para 7 lncRNAs expressos em ambas as frações, 7 expressos somente na fração polissomal e 8 somente na fração total. Os lncRNAs comuns são o **LINC01554**, **TP53TG1**, **LINC0968**, **DANCR** (discutidos anteriormente); **MAPKAPK5-AS1**, considerado um lncRNA relacionado com o sistema imune em pacientes com gliomas (WANG et al. 2017); **DNM3OS**, um lncRNA regulado por PPAR α , quando PPAR α está silenciado ou inibido, os níveis de expressão de DNM3OS é reduzido até aproximadamente 80-85%, já quando este está superexpresso os níveis de DNM3OS aumentam em até 4,5 vezes (LI et al. 2014). PPAR α , por sua vez, tem sua expressão aumentada durante a diferenciação adipogênica de hADSC (GOTO et al. 2011). Além disso, DNM3OS é um codificador dos microRNAs miR-124 e miR-199, que de forma curiosa, aparecem como sendo indispensáveis no desenvolvimento do esqueleto de mamíferos, além disso, camundongos nocautes também demonstraram redução no tamanho dos depósitos de gordura epididimal (WATANABE et al. 2008; DESVIGNES, CONTRERAS & POSTLETHWAIT 2014). Entretanto, recentes pesquisas demonstram que o miR-124 possui potencial inibitório da osteogênese (*in vitro*) e formação óssea (*in vivo*) (WANG et al. 2013; GUO et al. 2017). **GABPB1-AS1**, relatado como superexpresso durante estresses químicos em hiPSC (*human induced Pluripotent Stem Cells*) com exposição a peróxido de hidrogênio, cádmio e cicloheximida (TANI et al. 2014). Nossas amostras de POLI-seq foram submetidas a tratamento com cicloheximida o que poderia indicar um viés da expressão deste lncRNA, porém o mesmo foi visto up-regulado na fração total da diferenciação adipogênica a qual não é processada com adição da droga (Apêndice 9.1 e 10.1).

Os lncRNAs com ao menos uma referência vistos aumentados somente na fração polissomal são: **MIR210HG**, relacionado a hipóxia e câncer (LIN et al. 2015; MIN et al. 2016); **HOTAIR**, importante para a diferenciação adipogênica (discutido na sessão 4.7), **RP11-62F24.2**, **SNHG7** e **TMCC1-AS1**, ambos relatados na biologia do câncer (LIU et al. 2017; CUI et al. 2017) e **DHRS4-AS1** (discutido na sessão 4.7). Já os lncRNAs vistos up-regulados somente na fração total são: **NEAT1**, que possui papel importante na adipogênese (discutido anteriormente), **MIR145**, um precursor do miR-145, onde este em associação com HuR causa a degradação do mRNA de SOX2 em células-tronco derivadas de tecido adiposo (LATORRE et al. 2016), sendo o SOX2 conhecido por seu papel na manutenção

do estágio indiferenciado de células-tronco pluripotentes e como um potente inibidor dos processos de diferenciação adipogênico e osteogênico de células-tronco adultas (SCHONITZER et al. 2014). **PCA3**, **LINC00663**, **C1orf132** e **ZEB1-AS1**, relatados em diferentes tipos de câncer (LAI et al. 2017; BOZGEYIK et al. 2016; PENG et al. 2017 e SU et al. 2017); **RNU12**, associado a uma mutação na doença de ataxia cerebelar (ELSAID et al. 2017) e **SNORD3A**, um biomarcador da doença de Creutzfeldt-Jakob (COHEN et al. 2013).

4.6 – Comparação entre os lncRNAs diferencialmente expressos na adipogênese e osteogênese

Este trabalho visa descrever detalhadamente as características destes lncRNAs diferencialmente expressos no início da diferenciação de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo. Com isso, se faz importante a comparação entre as duas diferenciações estudadas aqui, visto que a célula de origem (hADSC) é a mesma para ambas. Como destacado por Mercer e colaboradores, a expressão dos lncRNAs possui uma especificidade tecidual e temporal (MERCER et al. 2009), sendo que em algumas pesquisas esta expressão tecido-específica dos lncRNAs pode chegar a 78% de especificidade, enquanto apenas 19% para os mRNAs (revisado em DEVESON et al. 2017). Esta consistência de expressão de lncRNAs em diferentes tipos teciduais sugere funções extremamente específicas e coordenadas, não sendo simplesmente um ruído do processo transcricional de genes codificadores de proteínas.

A comparação entre as frações TOTAL e POLISSOMAL dos lncRNAs aumentados demonstrou apenas uma pequena parcela de genes comuns entre as diferenciações osteogênica e adipogênica, sendo aproximadamente 13% na fração total e 15% na fração polissomal (Figura 31A e 31B).

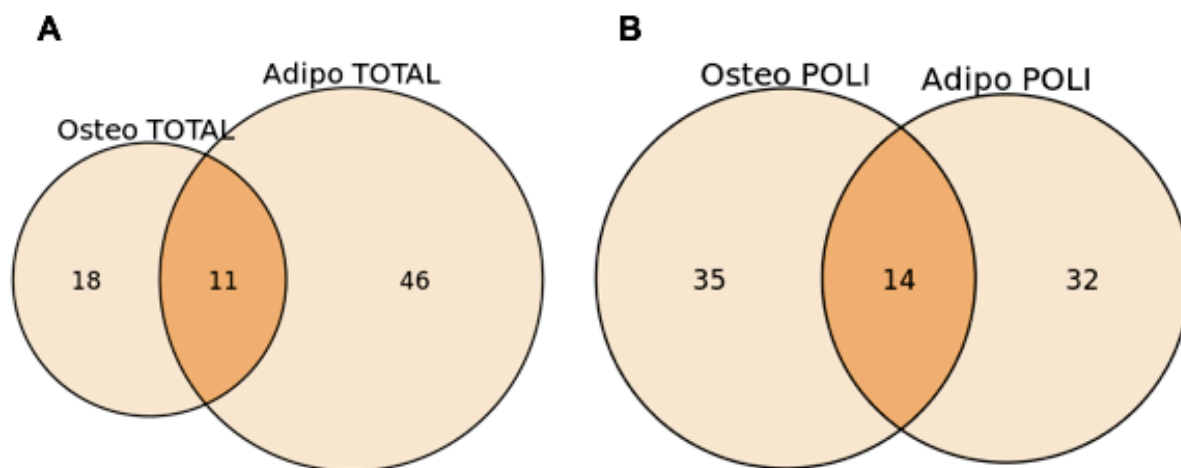


FIGURA 31: Diagrama de Euler representando a comparação entre os DEGs aumentados das diferenciações osteogênica e adipogênica de células-tronco. (A) Comparação entre as frações TOTAL e (B) comparação entre as frações POLISSOMAL.

O mesmo padrão foi visto ao compararmos os genes com expressão diminuída, sendo que apenas 19% dos transcritos da fração total e 9% da fração polissomal foram comuns em ambas as diferenciações (Figura 32A e 32B).

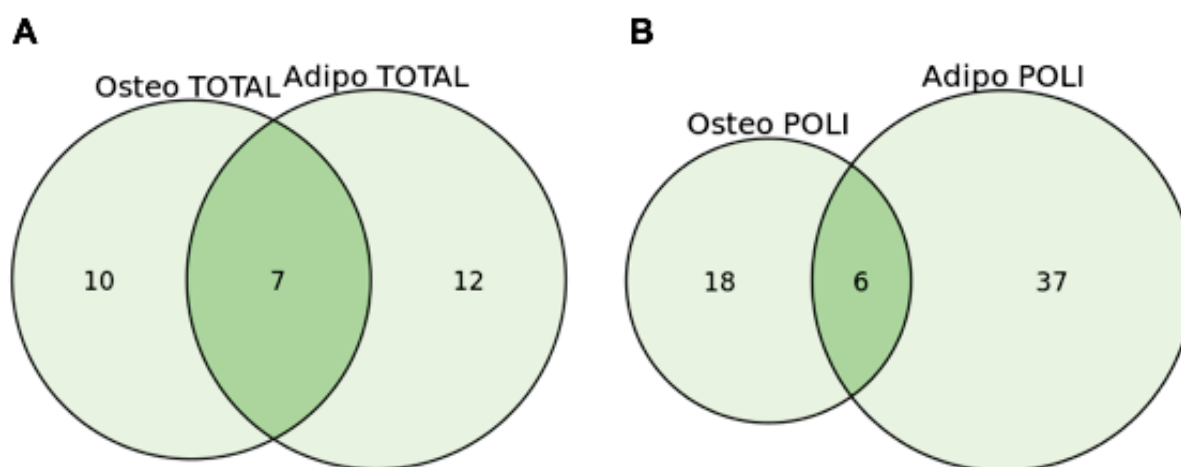


FIGURA 32: Diagrama de Euler representando a comparação entre os DEGs diminuídos das diferenciações osteogênica e adipogênica de células-tronco. (A) Comparação entre as frações TOTAL e (B) comparação entre as frações POLISSOMAL.

Essas comparações, evidenciam que logo no início da diferenciação de células-tronco derivadas de tecido adiposo (24h) há uma grande especificidade na expressão de lncRNAs nas diferenciações osteogênica e adipogênica, sendo que poucos elementos participam de ambas, tanto em nível transcricional quanto associados a maquinaria ribossomal. Isso pode nos indicar que logo nas primeiras

24h de diferenciação, as células induzidas já demonstram destinos distintos e característicos, além de uma regulação transcricional e pós-transcricional ímpar.

A fim de termos uma análise mais completa, comparamos as duas diferenciações em relação ao tamanho, número de exons e conteúdo GC dos lncRNAs diferencialmente expressos. Interessantemente, verificou-se que os lncRNAs com expressão aumentada durante o início da adipogênese possuem o conteúdo GC significativamente maior do que os lncRNAs osteogênicos na fração total e polissomal (Figura 33C e 33F, respectivamente), não havendo diferenças em relação ao comprimento e quantidade de exons.

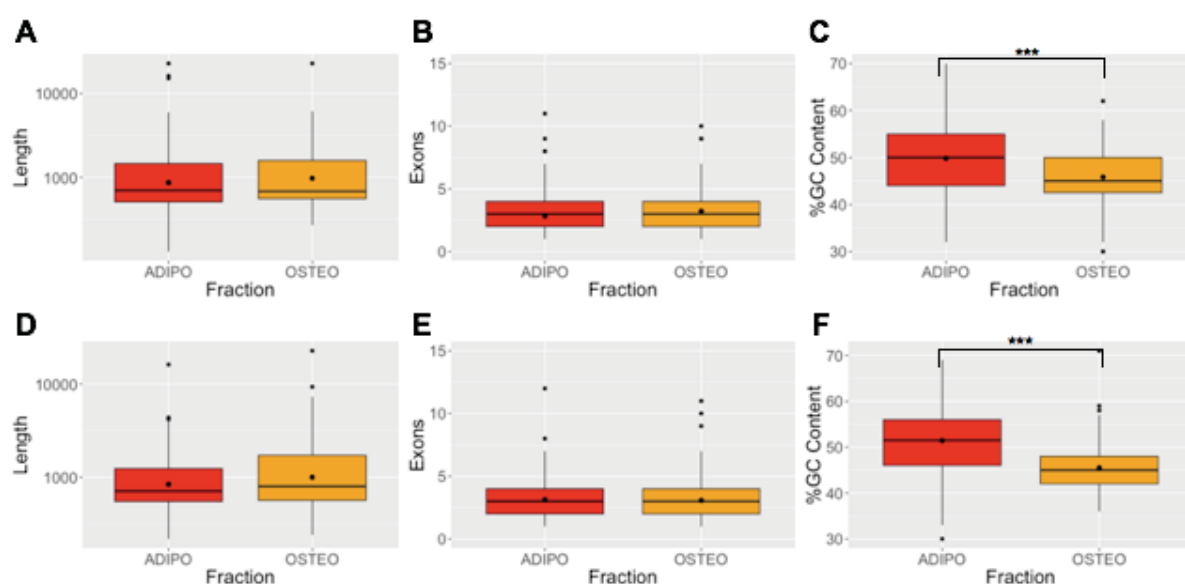


FIGURA 33: Comparação entre os lncRNAs diferencialmente expressos positivamente durante a adipogênese e osteogênese de hADSC nas frações TOTAL (A,B e C) e POLISSOMAL (D, E e F). (A-D) Comprimento dos transcritos em ambas as diferenciações, (B-E) número de exons e (C-F) conteúdo GC dos lncRNAs. Em vermelho os lncRNAs adipogênicos e em laranja os lncRNAs osteogênicos. *** $p < 0,01$.

Observou-se também que, os lncRNAs com expressão reduzida na fração polissomal durante a adipogênese possuem um tamanho sutilmente maior que os lncRNAs osteogênicos, porém significativo. Além disso, possuem um menor número de exons e um conteúdo GC significativamente maior (Figura 34D, 34E e 34F).

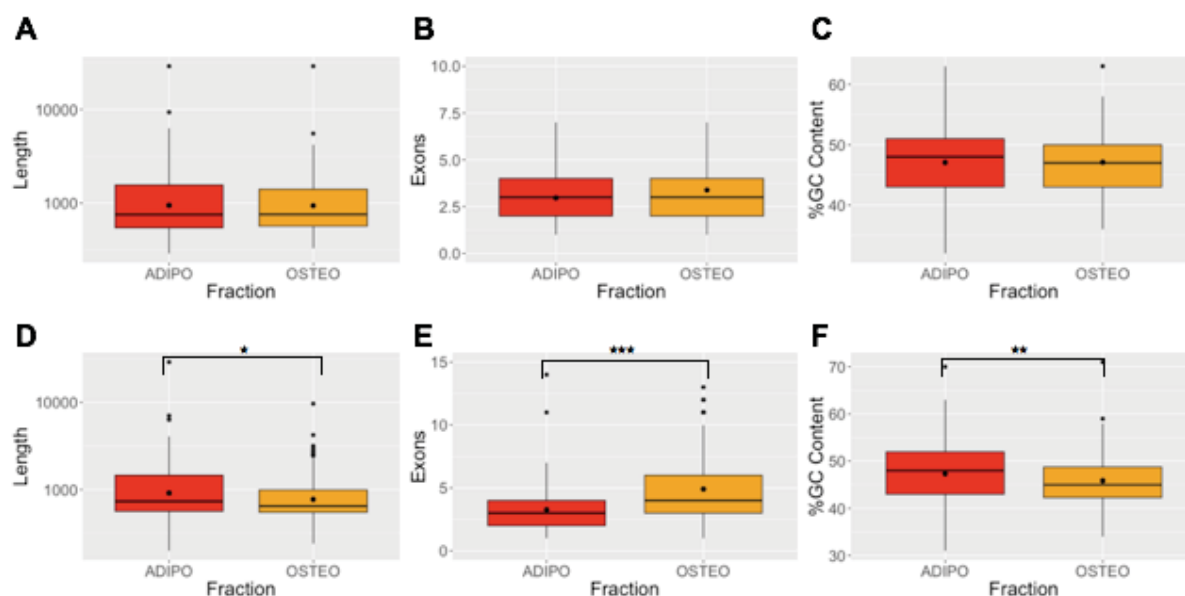


FIGURA 34: Comparação entre os lncRNAs diferencialmente expressos diminuídos durante a adipogênese e osteogênese de hADSC nas frações TOTAL (A,B e C) e POLISSOMAL (D, E e F). (A-D) Tamanho dos transcritos em ambas as diferenciações, (B-E) número de exons e (C-F) conteúdo GC dos lncRNAs. Em vermelho os lncRNAs adipogênicos e em laranja os lncRNAs osteogênicos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Um dos lncRNAs aumentados comuns entre as diferenciações adipogênica e osteogênica na fração total foi o NEAT1, previamente demonstrado como importante na regulação da adipogênese de células-tronco (GERNAPUDI et al. 2015; COOPER et al. 2014). Isto pode nos indicar que NEAT1 possua funções de regulação importantes nas duas diferenciações, representando uma via comum entre elas. De forma interessante NEAT1 foi encontrado somente na fração total da adipogênese, enquanto que na osteogênese foi encontrado em ambas as frações. Curiosamente, outro lncRNA aumentado comum entre as diferenciações na fração polissomal foi o DANCR, o qual já foi documentado como um lncRNA inibidor da osteogênese (ZHANG, TAO & WANG 2018).

4.7 – lncRNAs Antisentido

A função do *loci* de lncRNAs pode ser mediada através da transcrição ou do próprio transcrito. Esta última, através de mecanismos pré-transcricionais, como a regulação de proteínas modificadoras de cromatina e complexos de ribonucleoproteínas (RNPs) por estes transcritos; transcricionais, com efeitos

modulatórios na taxa de transcrição, transporte, *splicing* alternativo e distribuição celular; e ou através de mecanismos pós-transcricionais no citoplasma, como interação RNA-RNA. Os lncRNAs antisentido geralmente regulam a expressão de seus genes codificadores de proteínas da fita contrária (regulação *cis*), mas podem também regular genes distantes (regulação *trans*). De forma pós-transcricional, os lncRNAs podem atuar na expressão gênica através de competição endógena com microRNAs, através do controle da estabilidade de mRNAs e por meio da inibição ou aumento da tradução dos mRNAs (YONN et al. 2012; LIU et al. 2012; ABDELMOHSEN K et al. 2014).

Em um trabalho elegante, Carrieri et al. (2012) identificaram um lncRNA antisentido transcrito contrário ao gene murino Uchl1. Este lncRNA Uchl1-AS especificamente induz a produção da proteína UCHL1 quando as células estão sendo tratadas com rapamicina (inibidor de mTOR). Com isso, ao superexpressarem Uchl1-AS houve um aumento dos níveis da proteína UCHL1, porém os níveis de mRNA se mantiveram constantes, ou seja, ocorreu um aumento da taxa traducional deste mRNA. Interessantemente, para que este lncRNA tenha esta função é necessário que haja somente a sobreposição parcial das sequências (antisentido-sentido) de aproximadamente 73 nt incluindo o códon AUG, além de um elemento transponível SINEB2 (*Short Interspersed Repetitive Element B2*). Este mecanismo pode ser aplicado para outros genes antisentido-sentido, visto que ao utilizar sequências antisense de 72 nt construídas artificialmente contendo a região AUG do gene GFP e a extremidade 3' de Uchl1 contendo repetição SINEB2, foram capazes de induzir um aumento dos níveis de proteína GFP quando as células foram cotransfectadas com um plasmídeos GFP.

Por essa razão, analisamos o perfil dos lncRNAs antisentido aumentados e diminuídos e seus respectivos genes codificadores de proteínas transcritos no sentido contrário, tanto a nível transcricional (fração TOTAL), quanto a nível traducional (fração POLISSOMAL) (Apêndice 5). Podemos ver aqui, a expressão dos lncRNAs somente vistos na fração polissomal e seus genes codificadores da fita contrária em ambas as frações e que possuem expressão diferencial. Nota-se que alguns genes codificadores de proteínas tiveram padrão similar de expressão aos lncRNAs, outros apresentam uma maior expressão na fração polissomal do

que total e outros apresentam redução na expressão em ambas as frações (Figuras 35 a 38).

Pode-se reparar que a expressão de HOXC13 nas frações total e polissomal corresponderam com a expressão de seu lncRNA antisentido HOXC13-AS1 (Figura 35B). Chae et al. (2008), investigaram o papel da família de fatores de transcrição HOX durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas e demonstraram um aumento dramático da expressão de HOXC13 durante todo o processo de diferenciação osteogênica e, hipotetizou-se que sua regulação seria através da via BMP, visto que a superexpressão do inibidor de BMP resulta em diminuição da expressão de HOXC13 em camundongos (KULESSA et al. 2000). Porém, curiosamente podemos notar uma expressão de HOXC13-AS1 e seu respectivo gene antisentido similar na diferenciação adipogênica de hADSC (Figura 36B), o que pode nos indicar um papel importante destes genes em ambas as diferenciações. Por exemplo, Karastergiou e colaboradores demonstraram a expressão de HOXC13 (*ex vivo*) exclusivamente em depósitos subcutâneos de tecido adiposo gluteal, e em adipócitos gluteais isolados (*in vitro*)(KARASTERGIOU et al. 2013). Além disso, a expressão de HOXC13 está aumentada em liposarcomas, que são a forma mais comum de neoplasias de tecido mole, caracterizada pela proliferação de adipócitos neoplásicos (CANTILLE et al. 2013). Já o lncRNA AC007620.3 está, aproximadamente, duas vezes mais expresso nos polissomos do que seu gene na fita antisentido (GNB4)(Figura 35J). Porém, através de ensaios de proteômica, foi demonstrado que GNB4 se encontra aumentado durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais de medula óssea (GRANELI et al. 2014).

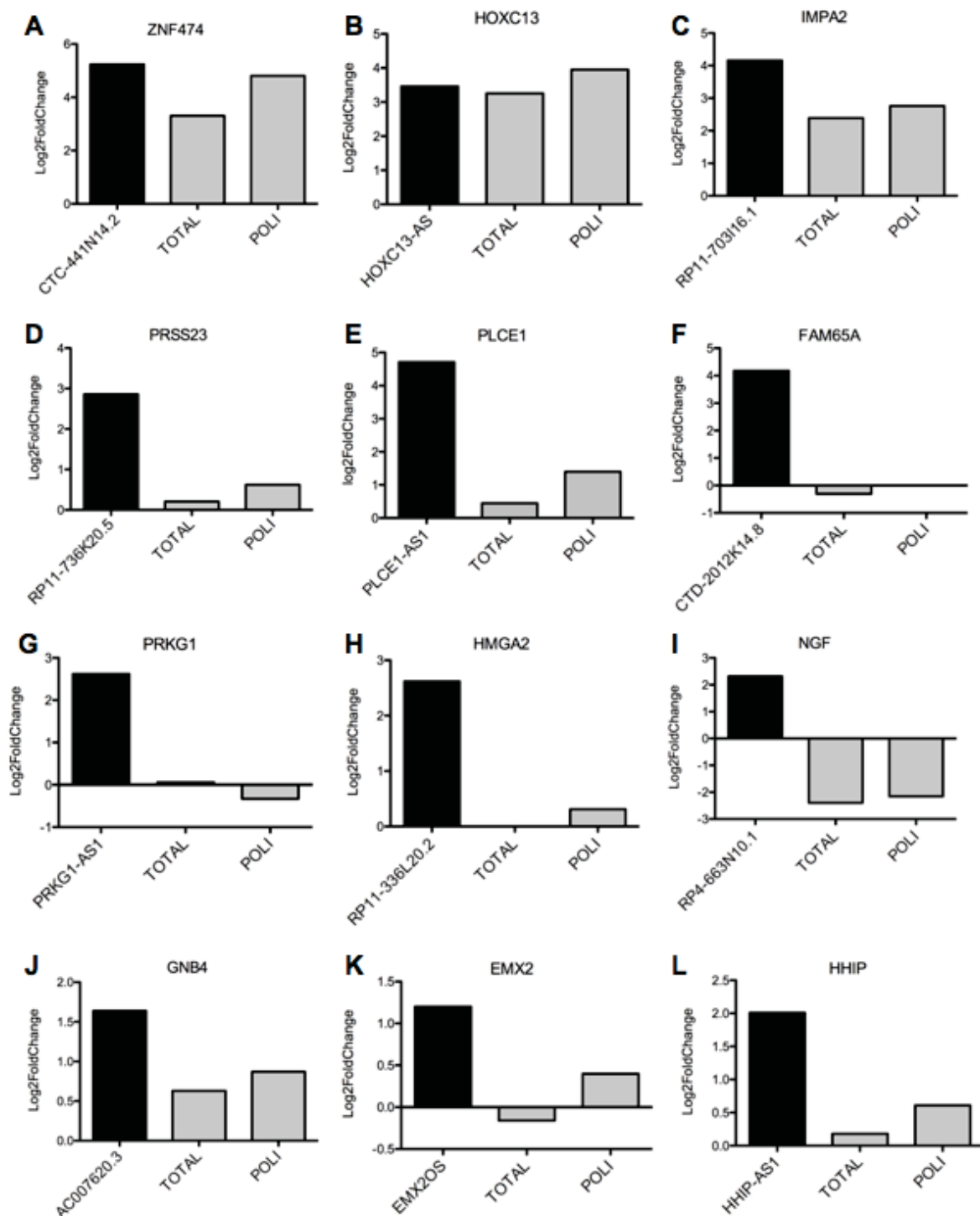


FIGURA 35: LncRNAs *antisense* aumentados na fração polissomal e seus respectivos genes codificadores de proteína na fita sentido, durante a diferenciação osteogênica (24h). (A) CTC-441N14.2/ZNF474, (B) HOXC13-AS1/HOXC13, (C) RP11-703I16.1/IMPA2, (D) RP11-736k20.5/PRSS23, (E) PLCE1-AS1/PLCE1, (F) CTD-2012K14.8/FAM65A, (G) PRKG1-AS1/PRKG1, (H) RP11-336L20.2/HMGA2, (I) RP4-663N10.1/NGF, (J) AC007620.3/GNB4, (K) EMX2OS/EMX2 e (L) HHIP-AS1/HHIP. Em preto, os lncRNAs; em cinza expressão dos mRNAs nas frações total e polissomal.

O lncRNA RP4-663N10.1, up-regulado nos polissomos, pode estar regulando negativamente a expressão de NGF, visto que a expressão deste está significativamente reduzida tanto na fração TOTAL quanto POLISSOMAL (Figura 35I). Quan et al., demonstrou uma diminuição na expressão de NGF em linhagens de hADSC diferenciadas para osteogênese e miogênese (QUAN et al. 2016). Porém, podemos verificar que o mesmo padrão é visto na diferenciação adipogênica (Figura 36H).

HHIP-AS1 é um lncRNA antisense do gene codificador HHIP, foi identificado e analisado através de microarranjo e qRT-PCR por Huang e colaboradores durante a diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo (14 dias de diferenciação) (HUANG et al. 2017). Aqui neste trabalho podemos ver que HHIP-AS1 é diferencialmente expresso logo nas primeiras 24 horas de diferenciação (Figura 35L). Seu gene codificador de proteínas HHIP tem funções como a modulação e interação com componentes da via Hedgehog, a qual é essencial no desenvolvimento ósseo e indução/manutenção da diferenciação osteogênica (KIM et al. 2010).

A figura 35G mostra o lncRNA PRKG1-AS1 up-regulado nos polissomos, enquanto seu gene codificador paralelo da fita contrária PRKG1 está down-regulado na fração polissomal. De fato, Jafari et al. demonstraram que ao utilizarem um inibidor das proteínas quinases A, C e G ocorre um aumento da diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais *in vivo* e *in vitro*. Ao investigarem os genes alvos de ação deste inibidor, identificaram o PRKG1 como um regulador negativo da diferenciação osteogênica (JAFARI et al. 2015).

Em relação aos lncRNAs antisense up-regulados durante a diferenciação adipogênica (24h), temos como exemplo o TBX2-AS1, que é antisense do gene TBX2, o qual é um fator de transcrição importante no controle do destino e diferenciação celular (Figura 36A). Todorovich e Khan estudaram a expressão de TBX2 em células-tronco mesenquimais derivadas de hemangioma, um tumor vascular benigno que tem como característica a diferenciação adipogênica na fase final, e constaram que estas células possuem alta expressão de TBX2, e ao silenciá-lo a diferenciação adipogênica foi completamente anulada. Quando superexpresso, o TBX2 levou a um aumento dramático na diferenciação adipogênica, possivelmente através da indução de C/EBP β , um já bem estudado marcador adipogênico (TODOROVICH & KHAN, 2013).

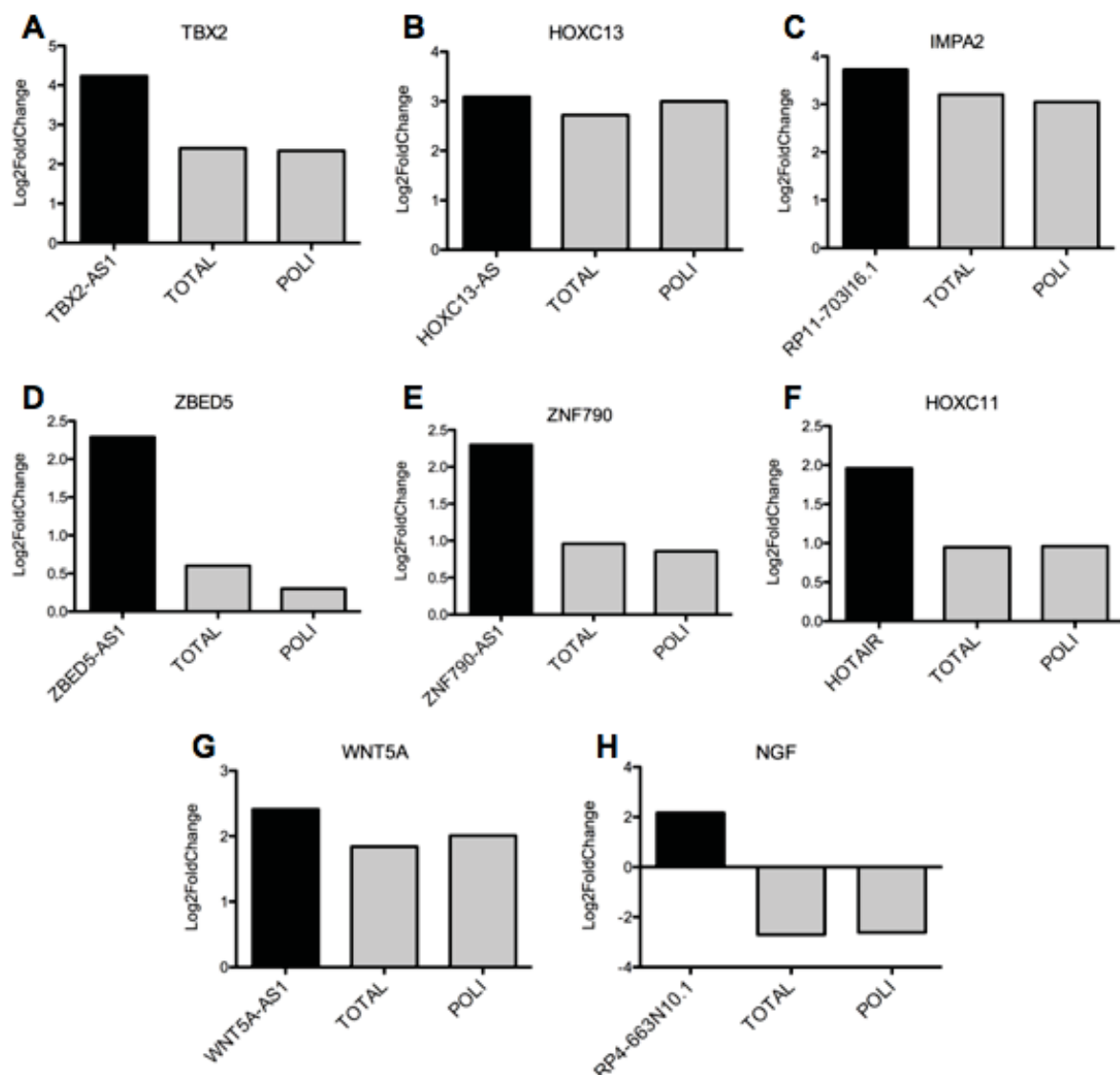


FIGURA 36: LncRNAs *antisense* aumentados na fração polissomal e seus respectivos genes codificadores de proteína na fita sentido, durante a diferenciação adipogênica (24h). (A) TBX2-AS1/TBX2, (B) HOXC13-AS1/HOXC13, (C) RP11-70316.1/IMPA2, (D) ZBED5-AS1/ZBED5, (E) ZNF790-AS1/ZNF790, (F) HOTAIR/HOXC11, (G) WNT5A-AS1/WNT5A, (H) RP4-663N10.1/NGF. Em preto, os lncRNAs; em cinza expressão dos mRNAs nas frações total e polissomal.

Podemos notar um padrão de expressão similar entre o lncRNA *antisense* WNT5A-AS1, com seu gene *protein-coding* da fita contrária WNT5A (Figura 36G). WNT5A é descrito como um gene da via não canônica WNT, sendo demonstrado que sua expressão reprime a diferenciação osteogênica em células-tronco derivadas de ligamento periodontal humanas, através da via de sinalização JNK (HASEGAWA et al. 2018). Além disso, sua expressão está aumentada no tecido

adiposo visceral, correlacionada com os níveis de JNK (ZURIAGA et al. 2017). Nishizuka e colaboradores comprovaram que a inibição da expressão de WNT5A preveniu o acúmulo de triacilglicerol em pré-adipócitos e diminuiu a expressão de genes relacionados a adipogênese (NISHIZUKA et al. 2008).

Nossos dados corroboram com a literatura em relação a expressão do lncRNA HOTAIR e seu gene paralelo HOXC11 (Figura 36F), sendo esses genes significativamente up-regulados em pré-adipócitos induzidos a diferenciação adipogênica por 14 dias (PINNICK et al. 2014). Ademais, quando superexpresso, HOTAIR causa o aumento da diferenciação adipogênica, além do aumento significativo nos genes relacionados a adipogênese (DIVOUX et al. 2014). HOTAIR pode estar cis-regulando a expressão de HOXC11, visto que, ao realizar uma deleção genômica de HOTAIR, ocorre uma desregulação dos genes HOXC11 e HOXC12 (AMÂNDIO et al. 2016), e este sistema parece ser conservado entre as espécies (KANG D et al. 2017).

Em relação aos lncRNAs down-regulados, um padrão similar de expressão entre o VLDLR-AS1 e VLDLR pode ser visto (Figura 37C), sendo que o VLDLR foi visto down-regulado nos dias 7 e 14 da diferenciação osteogênica de células-tronco de ligamento periodontal (CHOI et al. 2011). Porém, já é comprovada sua expressão no tecido adiposo e musculo esquelético, sendo up-regulado em adipócitos mediante os efeitos pró-adipogênicos de PPAR γ (TAO & HAJRI 2011).

Curiosamente, a expressão do lncRNA antisense MYHAS se mostrou similar ao seu gene codificador MYH2 (Figura 37A). MYH2 é um marcador de diferenciação miogênica. Bayati e colaboradores ao analisarem o potencial miogênico de células-tronco derivadas de medula óssea e tecido adiposo de ratos observou um aumento significativo de MYH2 após 21 dias de indução (BAYATI et al. 2013). Podemos notar tanto durante o início da osteogênese, quanto da adipogênese há uma inibição da expressão desses genes de forma transcricional e pós-transcricional (Figura 37A e Figura 38G).

O silenciamento do lncRNA Zfas1 em células epiteliais mamárias de camundongos ocasiona um aumento significativo na atividade proliferativa e metabólica destas células. No entanto, ao alinhar as sequências murinas e humanas de ZFAS1, apenas há uma moderada homologia, apesar da conservação evolutiva destes genes. Porém, ao comparar as estruturas secundárias, revelou-se diversas regiões que possuem quase estruturas idênticas

(ASKARIAN-AMIRI et al. 2011). Aqui pode-se ver que, ZFAS1 está down-regulado na fração polissomal durante o início da osteogênese, enquanto seu gene parceiro ZNFX1 sutilmente up-regulado (Figura 37D).

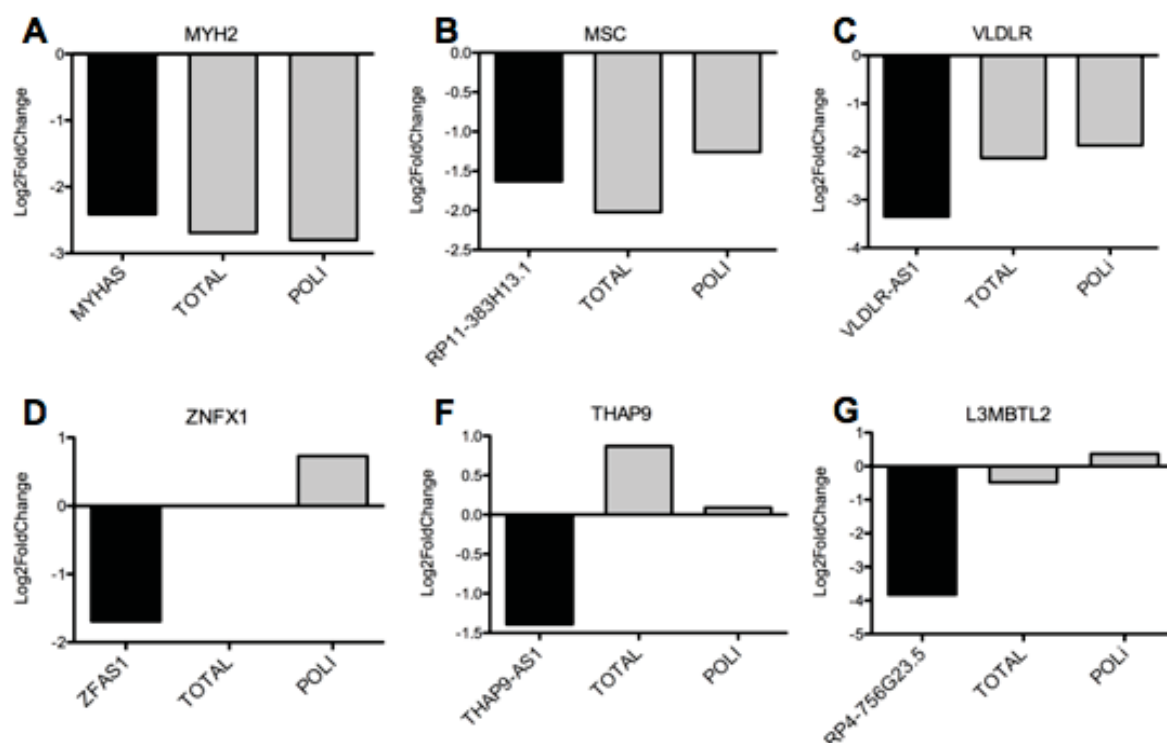


FIGURA 37: LncRNAs *antisense* diminuídos na fração polissomal e seus respectivos genes codificadores de proteína na fita sentido, durante a diferenciação osteogênica (24h). (A) MYHAS/MYH2, (B) RP11-383H13.1/MSC, (C) VLDLR-AS1/VLDLR, (D) ZFAS1/ZNFX1, (F) THAP9-AS1/THAP9 e (G) RP4-756G23.5/L3MBTL2. Em preto, os lncRNAs; em cinza expressão dos mRNAs nas frações total e polissomal.

LMO7, geralmente diminuído no estágio final da diferenciação adipogênica (BURTON et al. 2004), e tendo um papel crucial na diferenciação miogênica (DEDEIC et al. 2011), pode ser visto aqui diminuído logo no início da diferenciação, juntamente com seu lncRNA *antisense* LMO7-AS1 (Figura 38B). Já o lncRNA DLEU2 está significativamente diminuído nos polissomos enquanto o gene transcrito da fita contrária TRIM13 está modestamente aumentado em ambas as frações (Figura 38D). A região genômica e a estrutura dos genes são conservadas em humanos e camundongos, o que poderia nos indicar uma relação e regulação entre DLEU2/TRIM13 (CORCORAN et al. 2004).

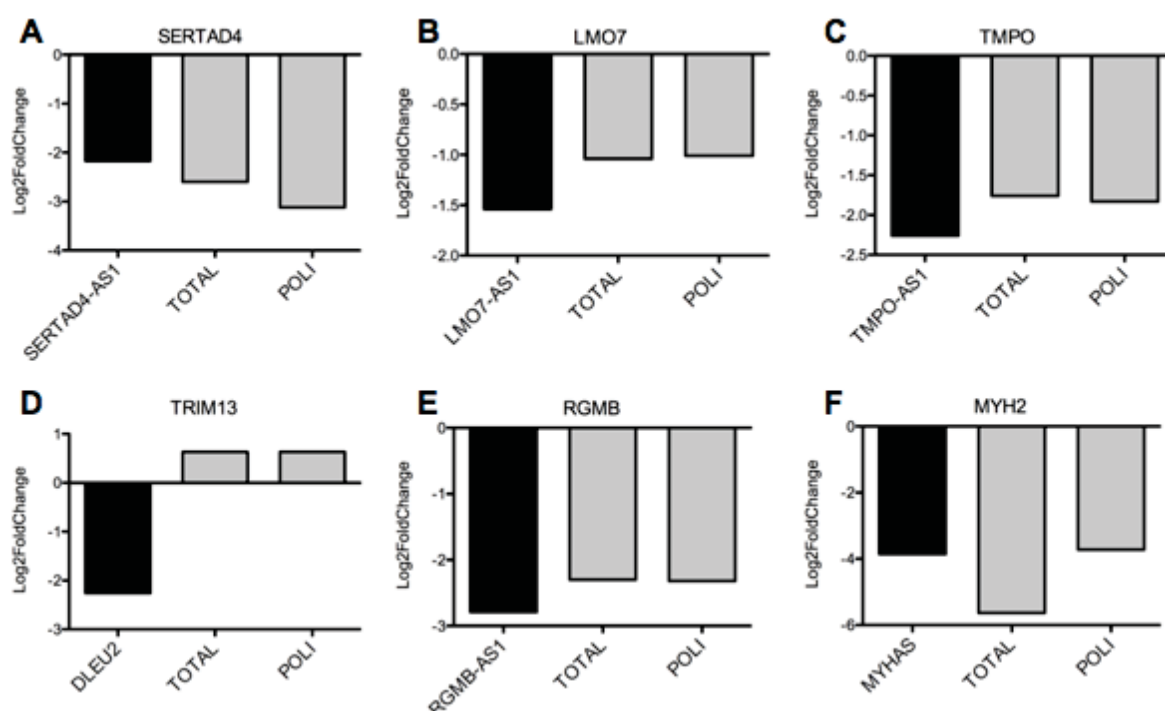


FIGURA 38: LncRNAs *antisense* diminuídos na fração polissomal e seus respectivos genes codificadores de proteína na fita sentido, durante a diferenciação adipogênica (24h). (A) SERTAD4-AS1/SERTAD4, (B) LMO7-AS1/LMO7, (C) TMPO-AS1/TMPO, (D) DLEU2/TRIM13, (F) RGMB-AS1/RGMB e (G) MYHAS/MYH2. Em preto, os lncRNAs; em cinza expressão dos mRNAs nas frações total e polissomal.

Recentemente, Goyal et al. caracterizaram o lncRNA antisentido NOP14-AS1 como um lncRNA induzido por danos ao DNA. Tanto NOP14-AS1, quanto seu mRNA da fita contrária são alterados devido a danos no DNA, sendo inversamente correlacionados (NOP14-AS1 aumentado e o mRNA NOP14 diminuído), entretanto, suas regulações são independentes uma da outra (GOYAL et al. 2017). Estes dados tornam a pesquisa dos genes sense-antisense mais complexa, visto que, são necessários experimentos individuais para cada par de genes para que haja uma maior compreensão acerca de suas regulações.

4.8 – Expressão de lncRNAs diferencialmente expressos

Para comprovar os dados vistos no sequenciamento em larga escala (RNA-seq), selecionamos lncRNAs aumentados nas frações POLISSOMAS de ambas as diferenciações. Analisando critérios como Log2FC e RPKM, foram

selecionados 2 lncRNAs diferencialmente expressos na fração polissomal osteogênica (PLCE1-AS1 e LINC00607), 2 lncRNAs diferencialmente expressos na adipogênese (AC104654.2 e SH3RF3-AS1), 2 transcritos comuns entre ambas as diferenciações (HOXC13-AS e RP1-272L16.1) e um único lncRNA encontrado aumentado na osteogênese e diminuído na adipogênese (LINC01018) (Quadro 9, Figura 39).

QUADRO 9 – LncRNAs selecionados da fração polissomal

lncRNA	Tipo	Log2FoldChange	ADIPO	OSTEO
PLCE1-AS1	Antisentido	4,70	X	
LINC00607	LincRNA	3,77	X	
AC104654.2	LincRNA	4,64		X
SH3RF3-AS1	Antisentido	3,09		X
HOXC13-AS	Antisentido	3,09 / 3,46		
RP1-272L16.1	LincRNA	5,95 / 5,61		
LINC01018	LincRNA	-3,06 / 1,71		

Aumentado; Diminuído; X Não demonstrado.

Para a construção dos oligonucleotídeos, buscamos identificar o transcrito alternativo destes lncRNAs diretamente no mapeio dos dados de RNA-Seq; e em caso de dificuldade em identifica-los, utilizamos o éxon com mais *reads* e comum as triplicadas. Portanto, para o PLCE1-AS1, o qual é um gene que deriva 4 transcritos, identificamos o transcrito ([ENST00000596633.5](#)) com comprimento de 1683 nt. O LINC00607 possui 6 transcritos alternativos, sendo aqui utilizado o transcrito ([ENST00000445174.5](#)) com comprimento de 3690 nt. O AC104654.2, também conhecido como LINC01914, possui 2 transcritos, sendo aqui visualizado o transcrito ([ENST00000436551.1](#)) com 769 nt de comprimento. O SH3RF3-AS1 possui apenas uma derivação com comprimento de 1604 nt ([ENST00000567491.1](#)), assim como o HOXC13-AS, que possui um transcrito de 1408 nt de comprimento ([ENST00000512916.2](#)). O gene do LINC01018 possui 4 transcritos alternativos, sendo aqui visto o transcrito ([ENST00000505626.5](#)) com comprimento de 3036 nt. E o RP1-272L16.1, que possui transcritos, aqui usado o transcrito com 863 nt de comprimento (ENST00000424696.6).

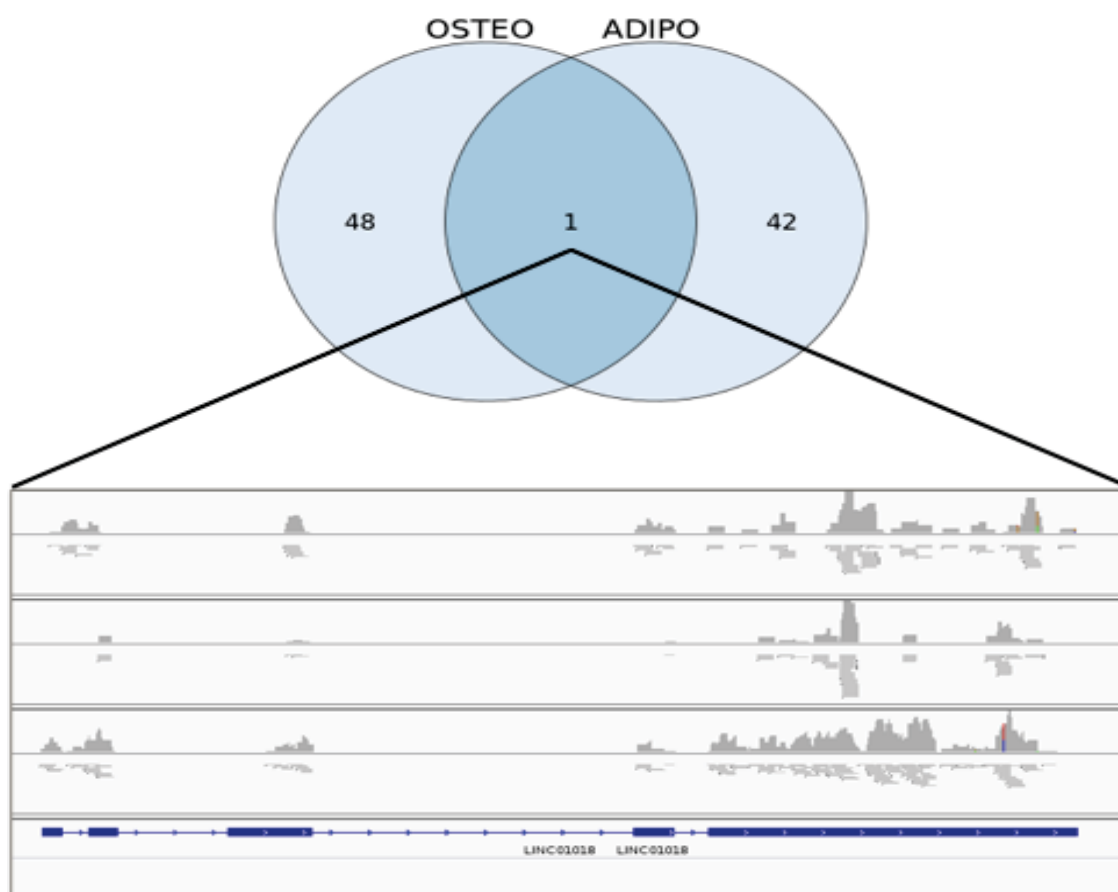


FIGURA 39: Identificação dos transcritos de lncRNA nos dados de sequenciamento em larga escala. Os sete lncRNAs polissomais selecionados para os ensaios de comprovação foram analisados para a identificação do transcrito sequenciado no RNA-seq. O LINC01018 foi o único lncRNA visto up-regulado na fração polissomal da osteogênese e down-regulado na diferenciação adipogênica.

Os ensaios de diferenciação celular para a formação de adipócitos e osteoblastos foram realizados, sendo então analisados através da expressão de marcadores específicos para adipogênese e osteogênese; e por intensidade de fluorescência para os marcadores Vermelho Nilo e OsteoImage™ (Lonza®), respectivamente. O RNA total foi extraído nos dias 0 (não induzidas), 1 (24h), 3 (72h), 7, 14 para adipogênese e para a osteogênese a adição do 21º dia.

O processo de diferenciação adipogênica (Figura 40) e osteogênica (Figura 41) foi realizado em triplicata biológica (Apêndice 2). As células em processo de diferenciação apresentaram a expressão dos marcadores característicos da adipogênese (Figura 42) e da osteogênese (Figura 43).

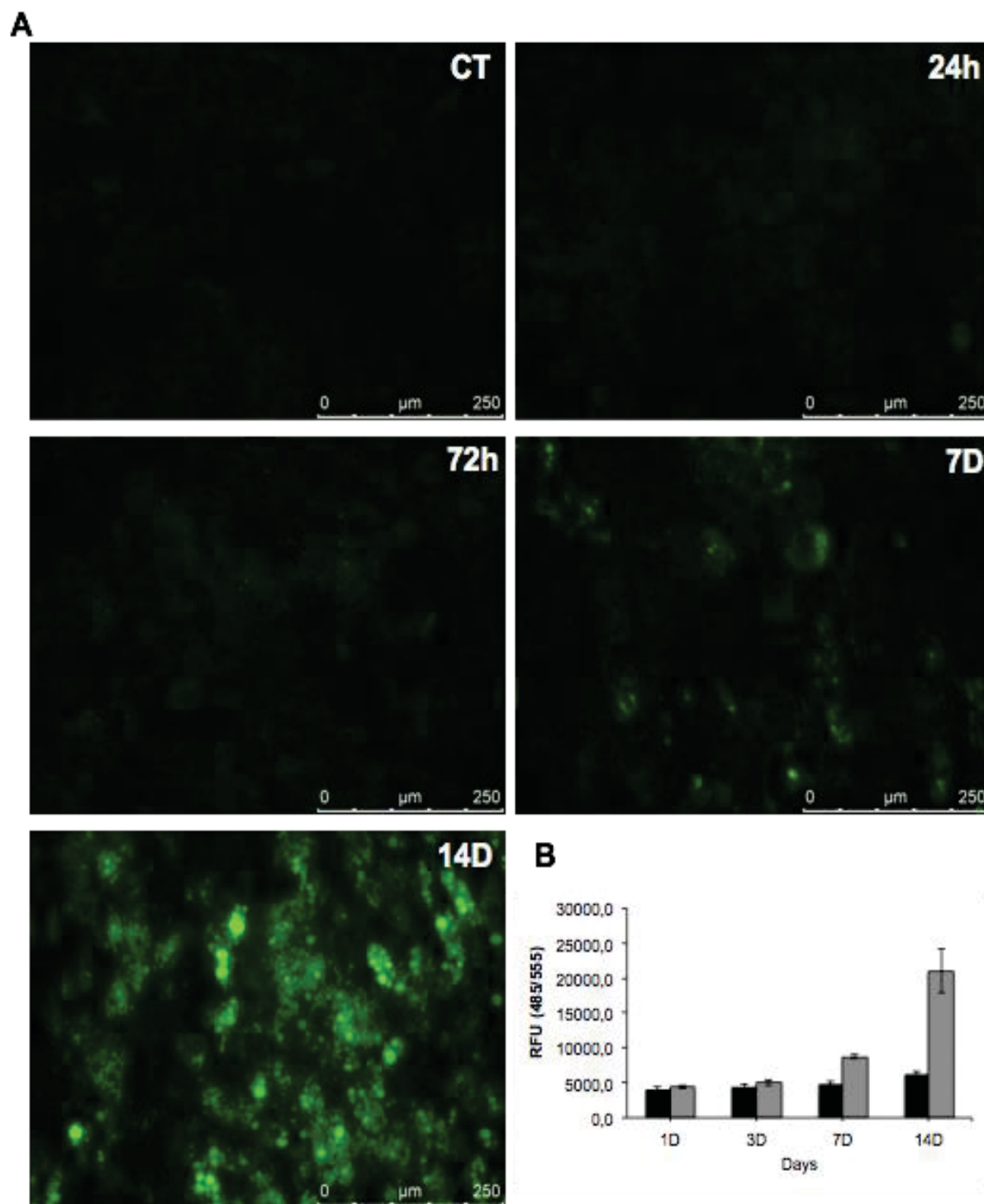


FIGURA 40: Diferenciação de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo induzidas à adipogênese por 14 dias. (A) Morfologia e marcação das vesículas lipídicas através de fluorescência e (B) quantificação através da mensuração de emissão da fluorescência através de vermelho Nilo (VN). CT (Controle), 24h (1D), 72h (3D), 7D e 14D. (B) Em preto, células não induzidas; em cinza, células induzidas.

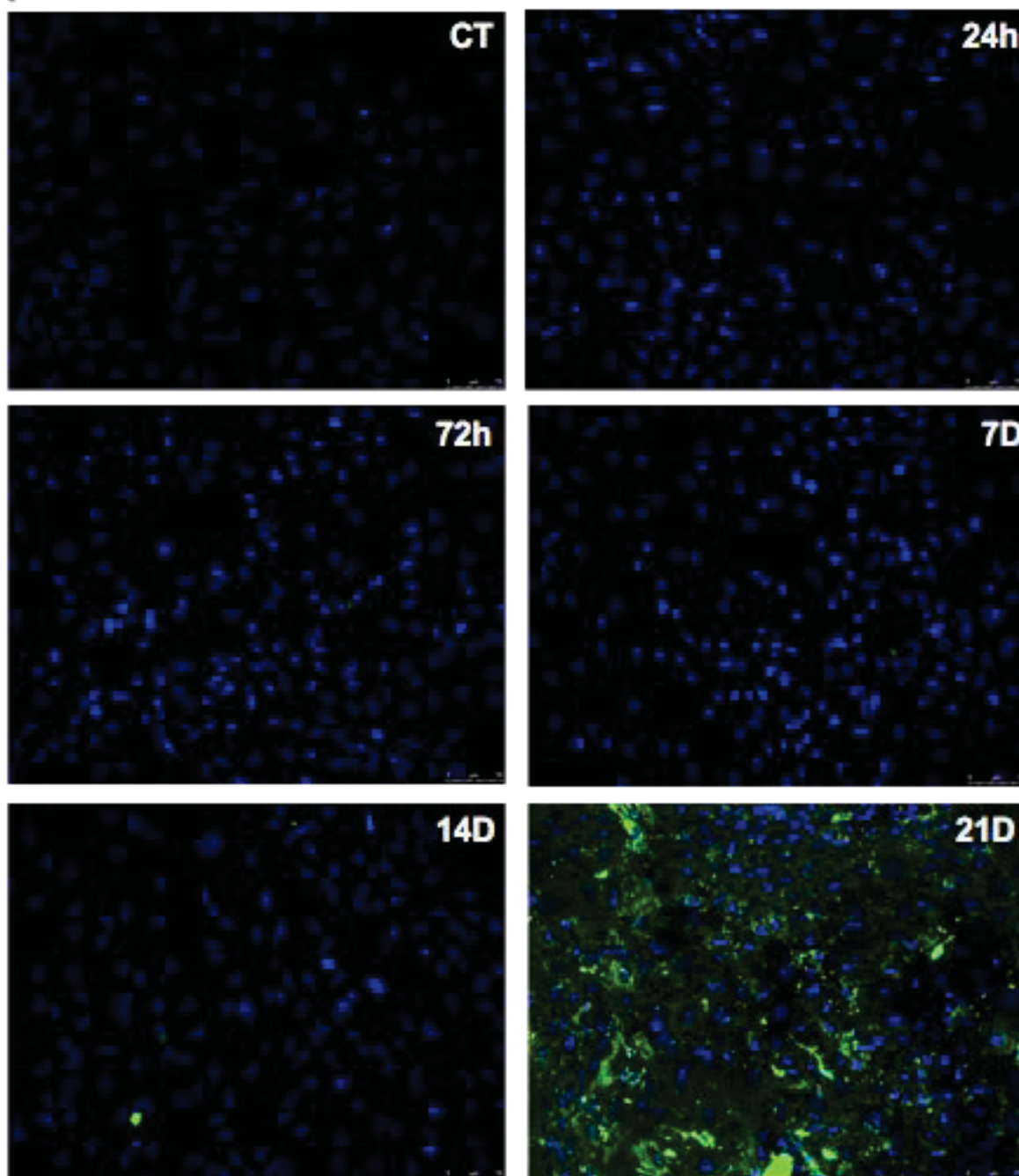
A

FIGURA 41: Diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo induzidas por 21 dias. Morfologia e marcação dos depósitos mineralizados compostos por hidroxiapatita através do kit OsteoImage™. Em azul: DAPI e em verde os depósitos de hidroxiapatita.

O marcador adipogênico FABP4, também conhecido como aP2, é uma proteína que se liga a ácidos graxos, caracteristicamente expressa em adipócitos e no tecido adiposo em si, tendo funções importantes no metabolismo lipídico e ativação hormonal (SHAN, LIU & KUANG 2013). Já o marcador PPAR γ 2, regula a diferenciação adipogênica em resposta a ativadores lipídicos endógenos, o que

modifica o metabolismo lipídico intracelular e é crucial para o processo de diferenciação de células-tronco (TONTONOV, HU & SPIEGELMAN 1994).

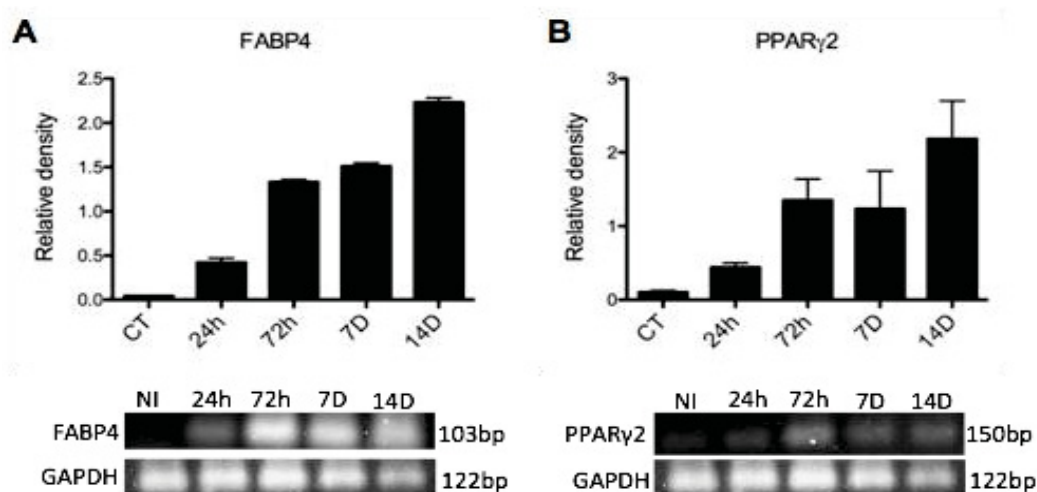


FIGURA 42: Expressão dos marcadores de diferenciação adipogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo. (A) Expressão durante a diferenciação adipogênica do marcador FABP4 e (B) de PPAR γ 2. (A-B) Semi-quantificação dos níveis de expressão da RT-PCR realizados com o software ImageJ, sendo os dados demonstrados como média e desvio-padrão de densitometria relativa ao GAPDH.

Já em relação as células comprometidas a osteogênese, ou seja, pré-osteoblastos, passam por um aumento na expressão e secreção de colágeno tipo I (COL1a1), conhecido como um marcador expresso no início e metade da diferenciação (KÖLLMER et al. 2013) e fosfatase alcalina (ALP), uma enzima envolvida na calcificação óssea em mamíferos (SHARMA, PAL & PRASAD 2014).

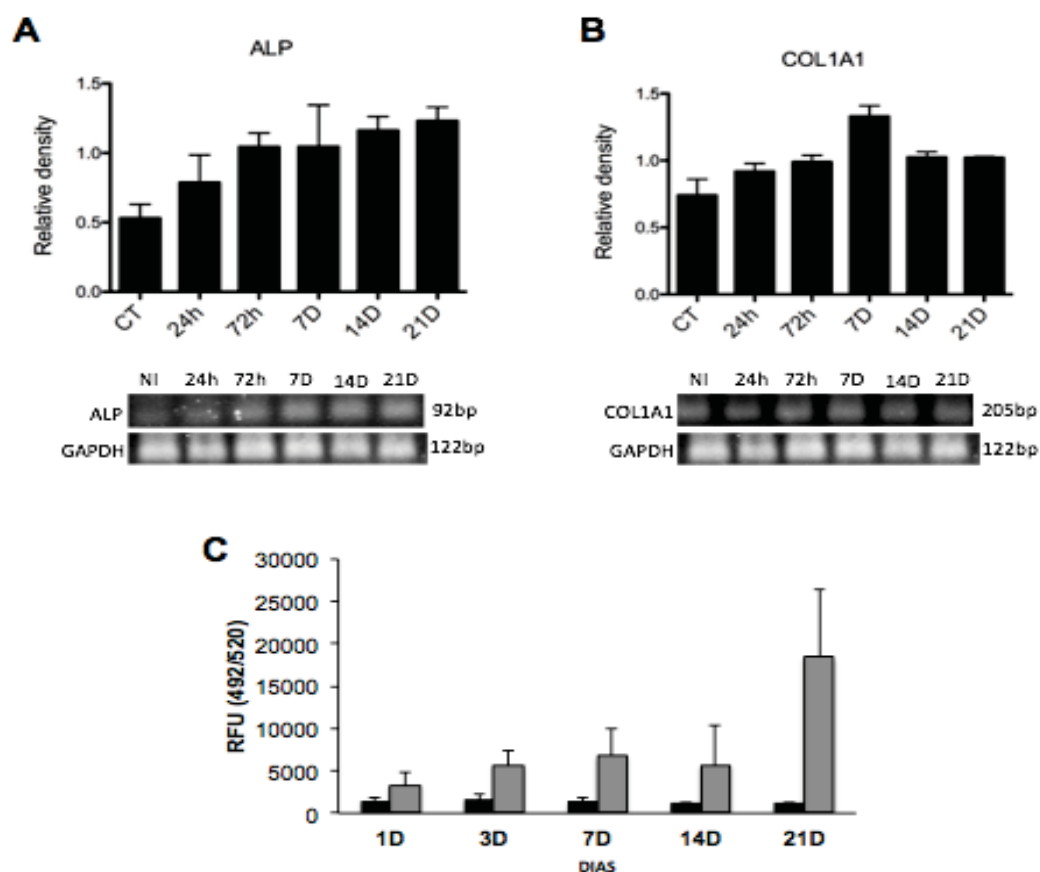


FIGURA 43: Expressão dos marcadores do processo de diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo e sua quantificação. (A) expressão do marcador osteogênico ALP e (B) COL1A1; (C) Quantificação da intensidade de fluorescência das células indiferenciadas e induzidas através do corante OsteoImage®. (A-B) Semi-quantificação dos níveis de expressão da RT-PCR realizados com o software ImageJ, sendo os dados demonstrados como densitometria relativa ao GAPDH. (C) Em preto, células não induzidas; em cinza, células induzidas.

Com isso, tivemos como objetivo a validação dos dados de RNA-Seq, através de PCR semi-quantitativa, da expressão dos lncRNAs diferencialmente expressos (24h). Comprovou-se portanto, um aumento significativo na expressão destes lncRNAs durante o início das diferenciações celulares (Figura 44). Seis lncRNAs selecionados foram validados, sendo o lncRNA HOXC13-AS1 não amplificado.

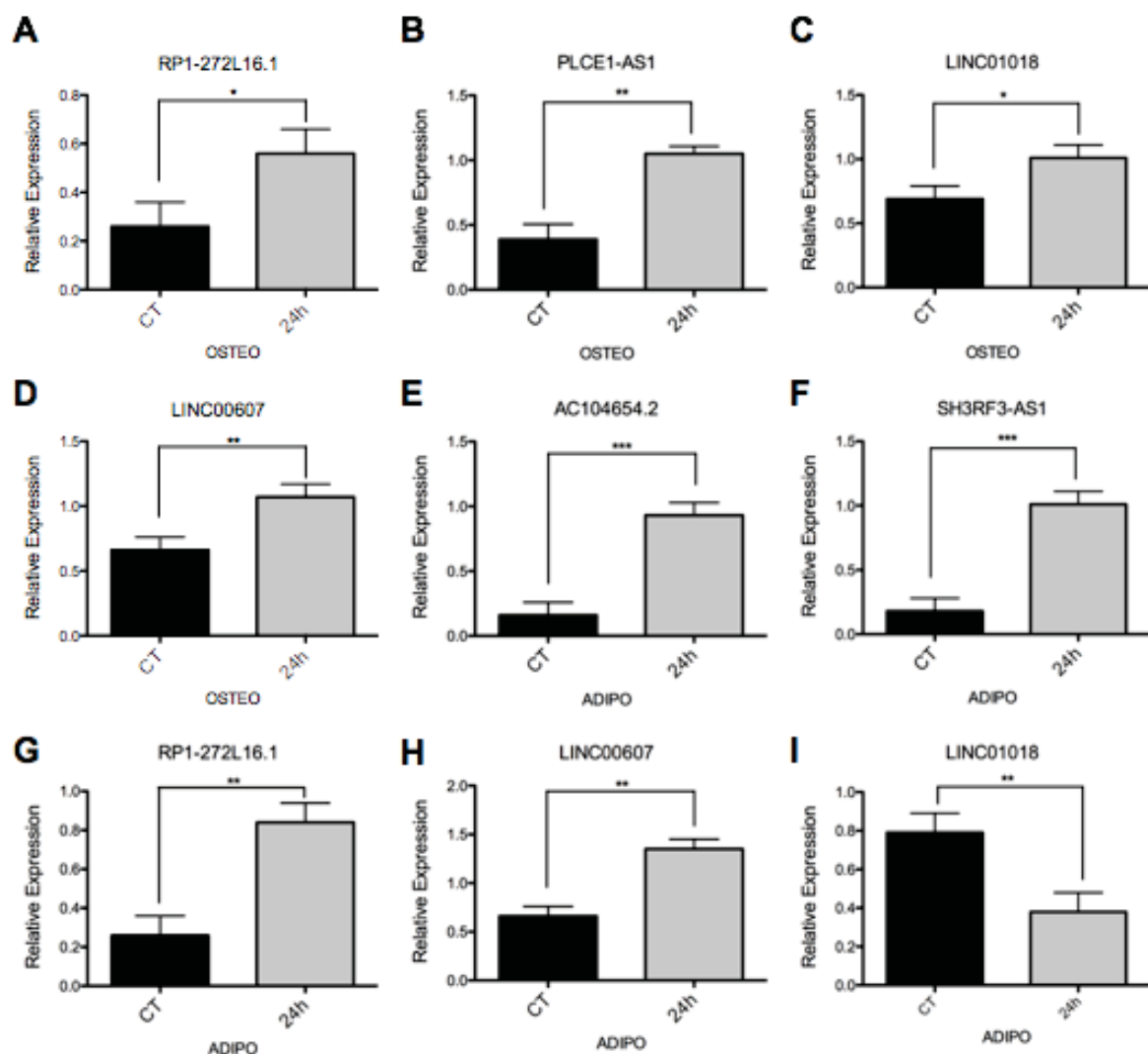
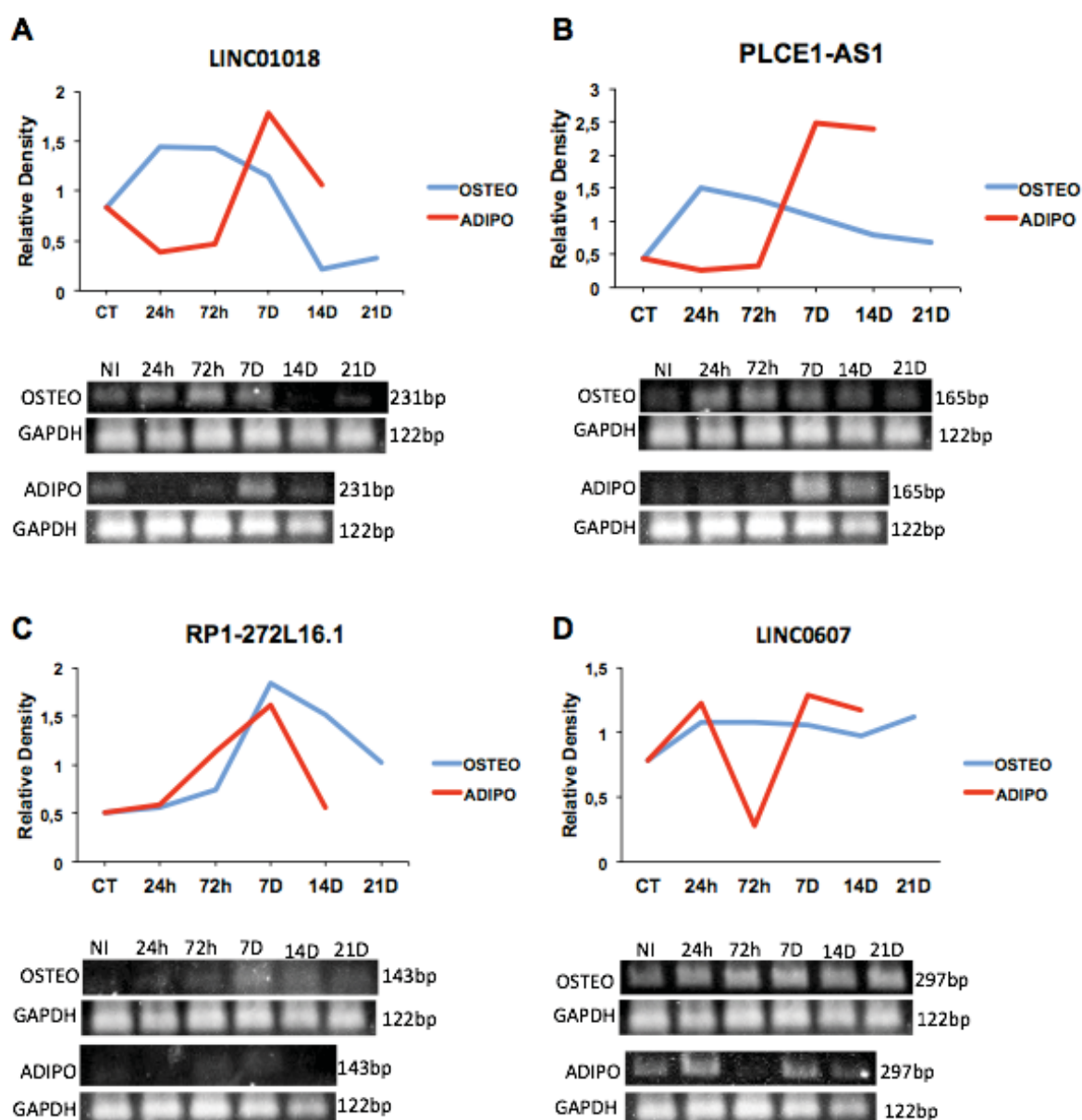


FIGURA 44: Expressão dos lncRNAs selecionados durante a indução das diferenciações osteogênica e adipogênica em hADSC. (A) Expressão de RP1-272L16.1 em células não induzidas (controle) e induzidas por 24h a diferenciação, (B) PLCE1-AS1; (C) LINC01018, (D) LINC00607 na osteogênese, (E) expressão de AC104654.2, (F) SH3RF3-AS1; (G) RP1-272L16.1; (H) LINC00607 e (I) LINC01018 na adipogênese. Semi-quantificação dos níveis de expressão da RT-PCR realizados com o software ImageJ, sendo os dados demonstrados como média e desvio-padrão de densitometria relativa ao GAPDH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

De forma interessante, ao visualizarmos durante todo o curso das diferenciações, a expressão dos lncRNAs selecionados, verificamos que o LINC01018 sofre um aumento de expressão até o 7º dia de diferenciação osteogênica e depois tem uma queda acentuada no 14º dia, sendo que, na diferenciação adipogênica seus níveis de expressão são reduzidos até o dia três, quando sofre um aumento expressivo no 7º dia (Figua 45A). Já o lncRNA RP1-272L16.1 apresenta uma expressão contínua na adipogênese e osteogênese

(Figura 45C). O lncRNA antisense PLCE1-AS1 aparece up-regulado nas primeiras 24 horas de diferenciação osteogênica e praticamente se estabiliza durante toda a diferenciação. Do contrário, na diferenciação adipogênica, apresenta um aumento da expressão a partir do 3º dia de diferenciação até o 7º (Figura 45B). Surpreendentemente, os transcritos LINC00607 e SH3RF3-AS1 sofrem um aumento da expressão no primeiro dia de indução adipogênica e uma queda acentuada no 3º dia, sendo novamente up-regulados no 7º dia (Figura 45D e 45F).



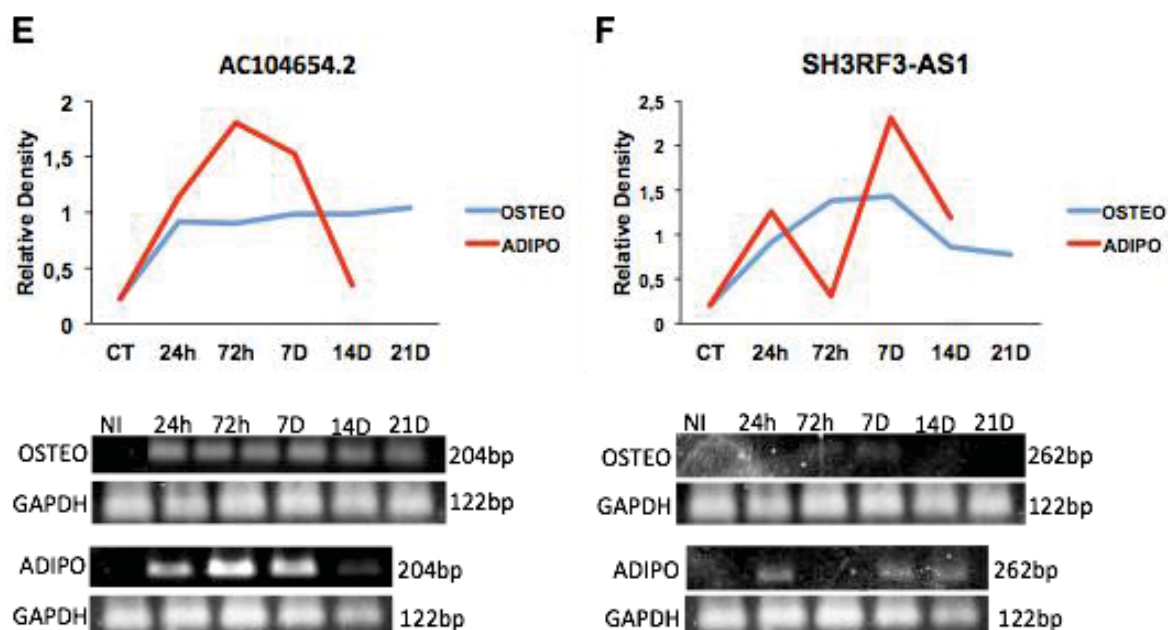


FIGURA 45: Expressão dos lncRNAs selecionados durante todo o processo de diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo. (A) LINC01018, (B) PLCE1-AS1, (C) RP1-272L16.1, (D) LINC00607, (E) AC104652.2 e (F) SH3RF3-AS1. Em azul, dias da diferenciação osteogênica e em vermelho, dias da diferenciação adipogênica.

4.9 – Interação lncRNAs-Ribossomos

Como nosso maior interesse de estudo são os lncRNAs associados a maquinaria traducional, investigamos evidências adicionais que suportem a noção de interação entre lncRNAs e ribossomos. Durante o processo de ultracentrifugação do ensaio de *Polysome Profile*, haveria a possibilidade de que lncRNAs associados a complexos não ribossomais, de alto peso molecular, co-sedimentassem com os polirribossomos, o que representaria um resultado falso positivo. Para explorar esta hipótese, realizamos novamente os ensaios de *Polysome Profiling*, porém agora, com adição da droga puomicina, a qual é um análogo de aminoacil-tRNA que seletivamente desfaz os polissomos, causando assim uma terminação prematura da tradução (Figura 46).

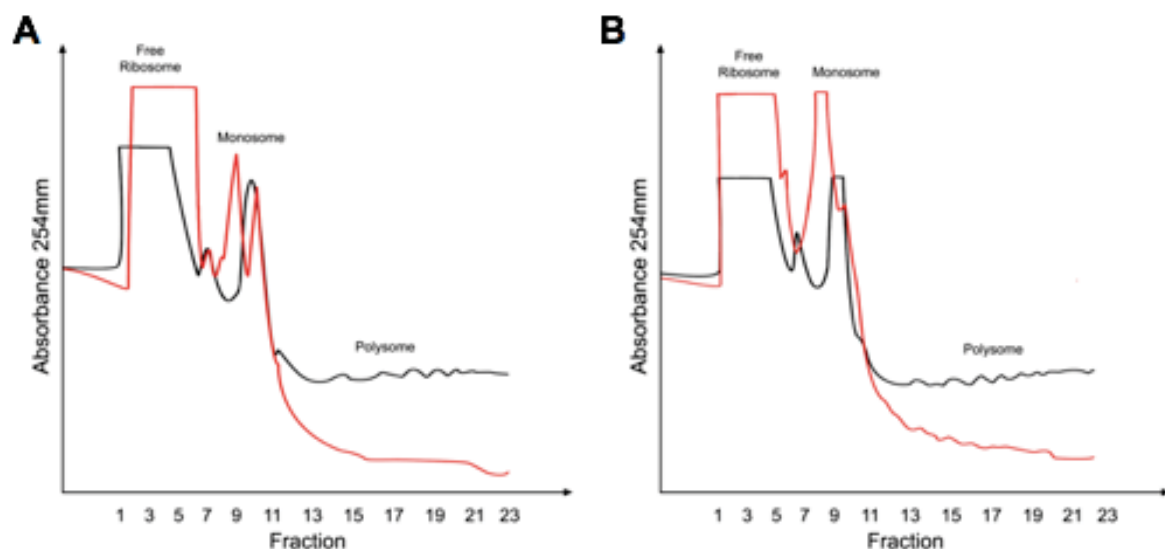
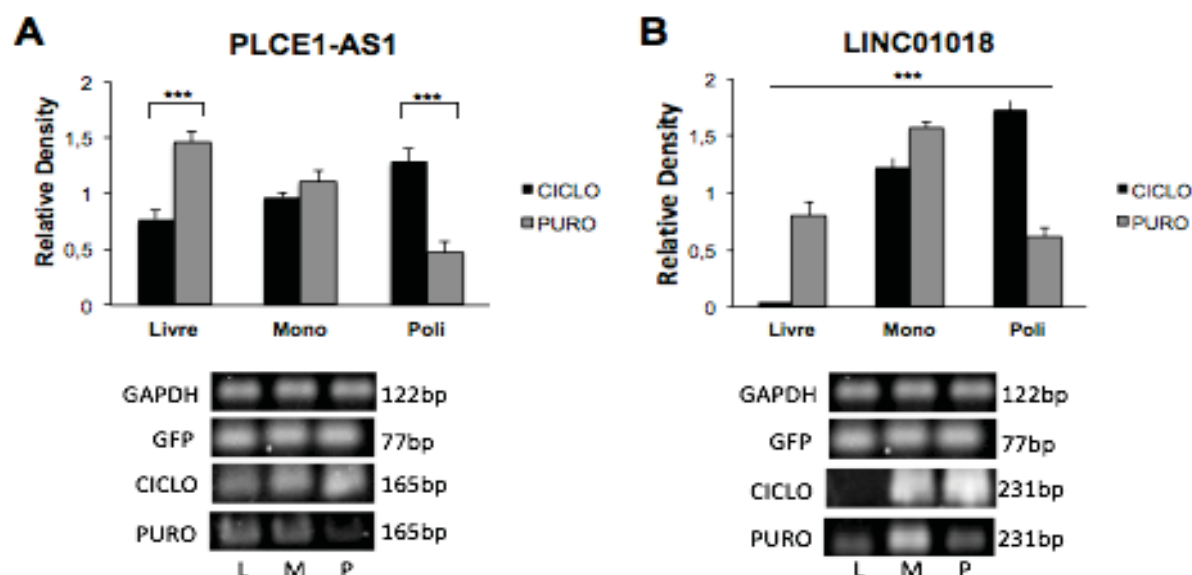


FIGURA 46: Perfil polissomal no início da diferenciação osteogênica (A) e adipogênica (B) de células-tronco derivadas de tecido adiposo. Em preto, perfil polissomal com adição de ciclohexemida e, em vermelho, perfil polissomal com adição de puromicina.

Com o tratamento com puromicina, os transcritos genuinamente associados aos ribossomos tendem a se deslocarem para as frações livre e monossomal, sendo aqui validados cinco de seis lncRNAs (Figura 47). Portanto, na maioria dos casos, a co-sedimentação durante a realização do perfil polissomal reflete uma interação física verdadeira entre os lncRNAs e os polirribossomos.



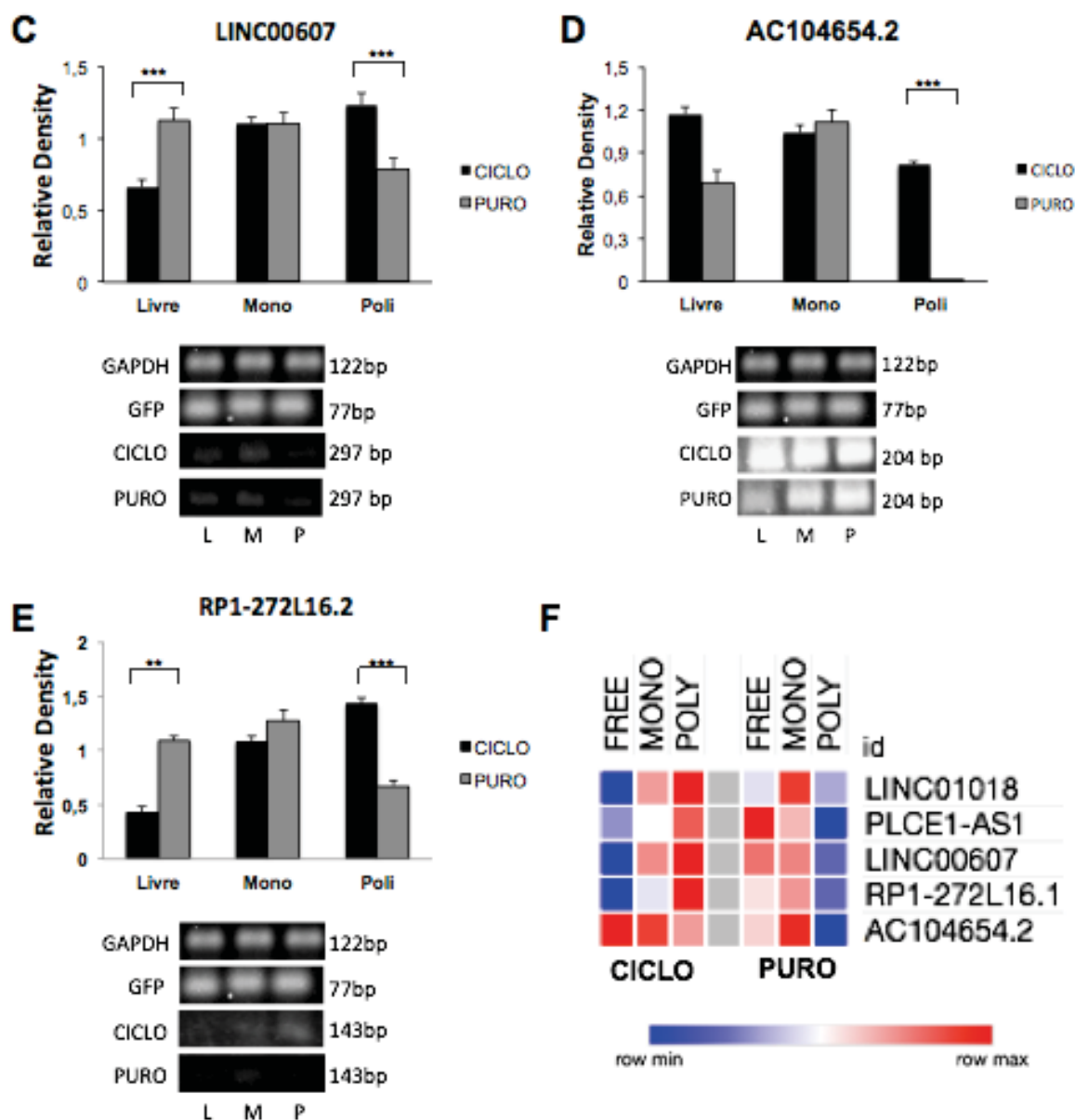


FIGURA 47: Validação da expressão e associação dos lncRNAs com os ribossomos através de Polysome Profiling com adição de cicloheximida e puromicina. (A) Expressão do lncRNA PLCE1-AS1, (B) LINC01018, (C) LINC00607, (D) AC104654.2 e (E) RP1-272L16.2; (F) Gráfico de Heatmap representativo dos valores de expressão vistos pela RT-PCR relativos a expressão de GFP. Em vermelho os valores mais altos de expressão e em azul os mais baixos. No quadro à esquerda os valores de expressão com adição de cicloheximida (CICLO) e no quadro à direita os valores com adição de puromicina (PURO).

4.10 – Potencial codificador de proteínas

A complexidade de se entender as possíveis funções desses lncRNAs associados a maquinaria traducional levanta questões acerca da possibilidade destes transcritos de traduzirem micro e ou pequenos peptídeos.

Com isso, através de métodos de predição *in silico*, foram analisados todos os lncRNAs associados a fração polissomal tanto da osteogênese, quanto da adipogênese. Os softwares utilizados, analisam características como: tamanho, extensão, qualidade e cobertura da ORF, frequências de nucleotídeos entre outras (ver MATERIAIS E MÉTODOS).

Portanto, a análise dos lncRNAs aumentados durante o início da diferenciação osteogênica identificou a possibilidade de 10 transcritos advindos de 3 genes (6%) pelo software CPAT, 37 transcritos de 15 genes (31%) pelo CPC, 17 transcritos de 8 genes (16%) pelo CPC2 e 16 transcritos de 7 genes (14%) pelo iSeeRNA (Figura 48A). Três lncRNAs foram demonstrados como codificadores de proteínas em todos os softwares utilizados, são eles: ASB16-AS1, RP11-159G9.5 e H19 (Quadro 10).

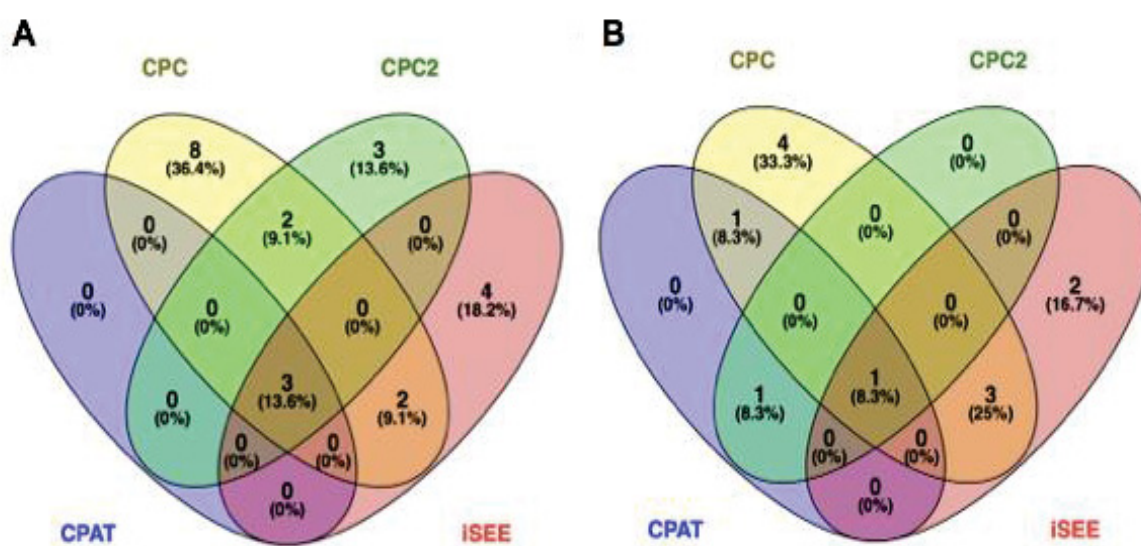


FIGURA 48: Potencial codificador de proteínas dos lncRNAs associados aos polissomos durante a diferenciação osteogênica (24h) de células-tronco derivadas de tecido adiposo. (A) lncRNAs aumentados, (B) lncRNAs diminuídos. Softwares utilizados: CPAT (*Coding-Potential Assessment Tool*), CPC (*Coding Potential Calculator*), CPC2 (*Coding Potential Calculator 2*) e iSeeRNA.

Já em relação aos lncRNAs diminuídos (Figura 48B), a possibilidade de 7 transcritos de 3 genes (12,5%) pelo CPAT, 22 transcritos de 9 genes (37,5%) pelo CPC, 2 transcritos de 2 genes (8%) pelo CPC2 e 5 transcritos advindos de 4 genes (17%) pelo iSeeRNA. Onde, apenas um lncRNA foi visualizado em todos os softwares: VLDLR-AS1 (Quadro 10).

QUADRO 10 – Potencial codificante dos OSTEOLncRNAs polissomais.

SOFTWARE	UP-REGULADOS	DOWN-REGULADOS
CPAT	ASB16-AS1	RP11-383H13.1
	RP11-159G9.5	ZFAS1
	H19	VLDLR-AS1
CPC	CTD-2012K14.8	JPX
	ASB16-AS1	THAP9-AS1
	EMX2OS	FLJ22447
	H19	RP11-383H13.1
	LINC00475	EPB41L4A-AS1
	LINC00607	ZFAS1
	LINC01018	RP11-1002K11.1
	LINC01554	VLDLR-AS1
	NEAT1	MIR503HG
	PLCE1-AS1	
	RP11-159G9.5	
	RP11-366L20.2	
	RP11-867G23.10	
	TP53TG1	
	LINC00312	
CPC2	AP000892.6	MSC-AS1
	ASB16-AS1	VLDLR-AS1
	EMX2OS	
	H19	
	RP11-159G9.5	
	RP11-366L20.2	
	RP5-1028K7.2	

	CTD-3024O7.12	
iSEERNA	ASB16-AS1	WFDC21P
	HOXC13-AS	RP11-383H13.1
	NEAT1	VLDLR-AS1
	RP11-159G9.5	MIR503HG
	RP11-47A8.5	
	CTD-2369P2.2	
	H19	

*Em vermelho: lncRNAs visualizados em todas as análises dos diferentes softwares.

Os lncRNAs aumentados que demonstraram possuir um potencial de codificar peptídeos tiveram média de tamanho de 1794 nucleotídeos nas quatro análises, sutilmente maior que a média de todos os lncRNAs vistos up-regulados na fração polissomal (1494 nt) (Figura 49A). Entretanto, tiveram um tamanho da ORF principal, significativamente maior ($p < 0,0001$) (Figura 49C). Para os lncRNAs down-regulados com potencial de codificar proteínas a média de tamanho foi de 1159 nt, também sutilmente maior que a média de 962 nucleotídeos de todos os lncRNAs down-regulados na fração polissomal (Figura 49B). Novamente, o tamanho da ORF principal foi significativamente maior ($p < 0,0001$) (Figura 49D).

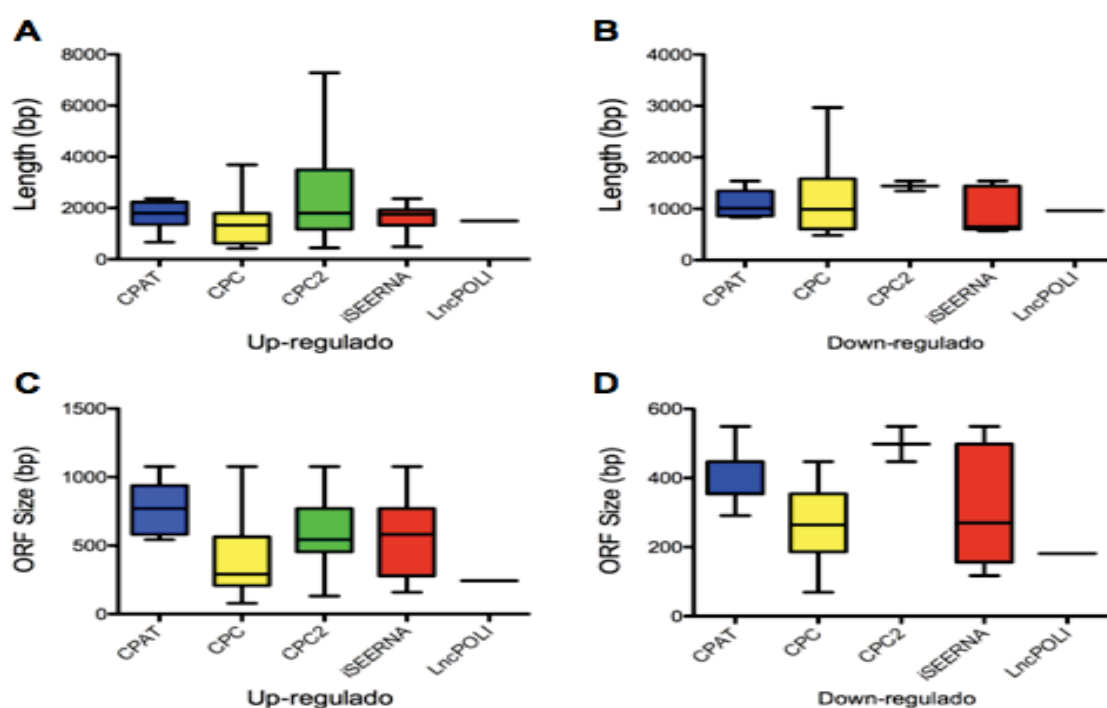


FIGURA 49: Análise dos lncRNAs diferencialmente expressos no início da osteogênese com potencial de codificar peptídeos. (A-C) Tamanho dos lncRNAs aumentados e de suas ORFs codificantes e (B-D) tamanho dos lncRNAs diminuídos e de suas ORFs codificantes. Comparação com a média de tamanho dos transcritos e das ORFs da fração polissomal (LncPOLI).

Com isso, os possíveis peptídeos derivados dos lncRNAs convergentes em todas as análises dos softwares foram analisados em bancos de dados de proteínas, a fim de procurar regiões de similaridade ou homologia entre as sequências. O putativo polipeptídeo derivado do lncRNA RP11-159G9.5 (358 aa) demonstrou identidade de 37% (cobertura de alinhamento 81%) com a proteína ZNF15 (563 aa), a qual pode atuar na regulação transcricional já que possui atividade de ligação a DNA (UniProtKB/SwissProt). Porém ao analisar todos os bancos de proteínas disponíveis, o putativo peptídeo mostrou 100% de identidade (cobertura de alinhamento 96%) com a proteína ZNF654 (581 aa), a qual também atua na regulação transcricional através de ligação ao DNA. Aparentemente, esse putativo polipeptídeo parece ser uma isoforma da proteína ZNF654 visto a porcentagem de identidade entre ambas. Esse pode ser um caso de problemas relacionados ao mapeio dos genes com o genoma de referência. Já para o putativo peptídeo da ORF principal do ASB16-AS1 (193 aa) já existe o registro (Q495Z4.2) porém ainda permanece como uma proteína não caracterizada. O possível polipeptídeo do H19 (256 aa) mostrou 100% de identidade (cobertura de alinhamento 100%) com uma isoforma da proteína CRA_a (256 aa, gene hCG1640777). Por fim, o peptídeo de VLDLR-AS1 (109 aa) demonstrou 98% de identidade (cobertura de alinhamento 100%) com uma proteína não nomeada e caracterizada até o momento (código de acesso BAG52534).

Dos lncRNAs aumentados durante a diferenciação adipogênica, identificamos a possibilidade de 11 transcritos advindos de 8 genes (17%) pelo software CPAT, 4 transcritos de 3 genes (6,5%) pelo CPC, 12 transcritos de 9 genes (19,5%) pelo CPC2 e 12 transcritos derivados de 9 genes (19,5) pelo iSeeRNA (Figura 50A)

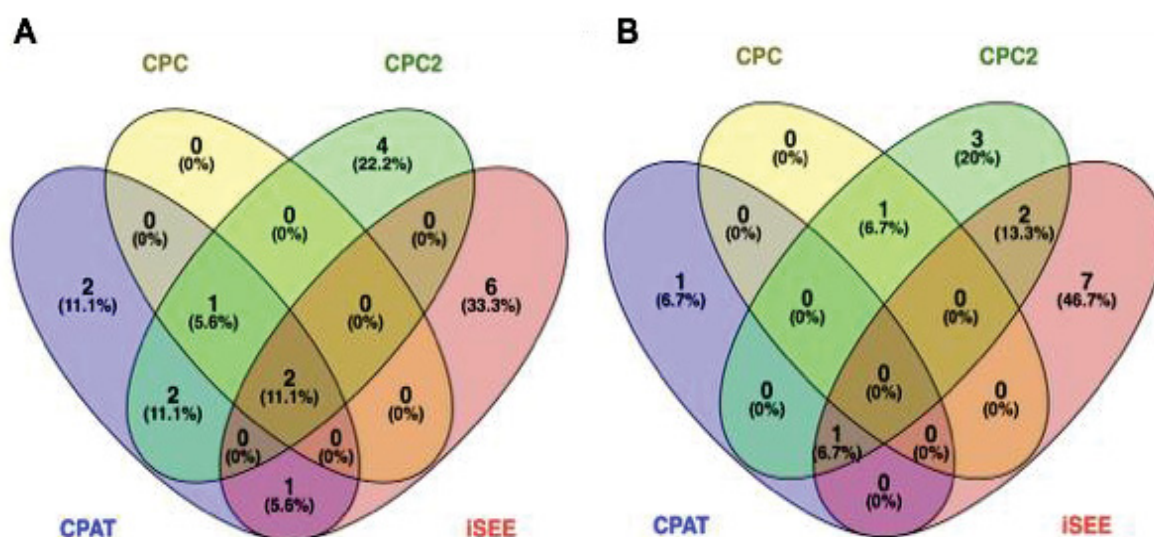


FIGURA 50: Potencial codificador de proteínas dos lncRNAs associados aos polissomos durante a diferenciação adipogênica (24h) de células-tronco derivadas de tecido adiposo. (A) lncRNAs aumentados, (B) lncRNAs diminuídos. Softwares utilizados: CPAT (*Coding-Potential Assessment Tool*), CPC (*Coding Potential Calculator*), CPC2 (*Coding Potential Calculator 2*) e iSeeRNA.

Em relação aos lncRNAs diminuídos, houve a possibilidade de 2 transcritos de 2 genes (4,6%) pelo CPAT, 1 transcrito de 1 gene (2%) pelo CPC, 8 transcritos advindos de 7 genes (16%) pelo CPC2 e 10 transcritos de 5 genes (12%) pelo iSeeRNA (Figura 50B, Quadro 11)

QUADRO 11 – Potencial codificante dos ADIPO-lncRNAs polissomais.

SOFTWARE	UP-REGULADOS	DOWN-REGULADOS
CPAT	TMCC1-AS1	DLEU2
	SNHG7	LINC01119
	RP3-428L16.2	
	RP11-159G9.5	
	NDUFA6-AS1	
	MZF1-AS1	
	LINC01588	
CPC	HOTAIR	
	SNHG7	LINC01239
	RP11-159G9.5	
CPC2	LINC01588	
	LINC01588	AC016831.1

	MAPKAPK5-AS1	AC058791.1
	MZF1-AS1	CTD-3099C6.9
	NDUFA6-AS1	DLEU2
	RP11-54O7.3	LINC00856
	RP11-159G9.5	LINC01239
	RP4-758J18.2	MIR4435-2HG
	RP5-1028K7.2	
	SNHG7	
iSEERNA	WNT5A-AS1	SERTAD4-AS1
	HOXC13-AS	DLEU2
	RP11-62F24.2	TMPO-AS1
	RP11-159G9.5	CTD-3099C6.9
	RP3-428L16.2	LINC00856
	SNHG7	
	DANCR	
	TBX2-AS1	
	GABPB1	

*Em vermelho: lncRNAs visualizados em todas as análises dos diferentes softwares.

Os lncRNAs aumentados que demonstraram possuir um potencial de codificar peptídeos tiveram média de tamanho de 1509 nucleotídeos nas quatro análises, sutilmente maior que a média de todos os lncRNAs vistos up-regulados na fração polissomal (1236 nt) (Figura 51A). Entretanto, tiveram um tamanho da ORF principal significativamente maior ($p < 0,0001$) (Figura 51C). Para os lncRNAs down-regulados com potencial de codificante, a média de tamanho foi de 2095 nt, maior que a média de 1277 nucleotídeos de todos os lncRNAs down-regulados na fração polissomal (Figura 51B). Novamente, o tamanho da ORF principal foi significativamente maior ($p < 0,0001$) (Figura 51D).

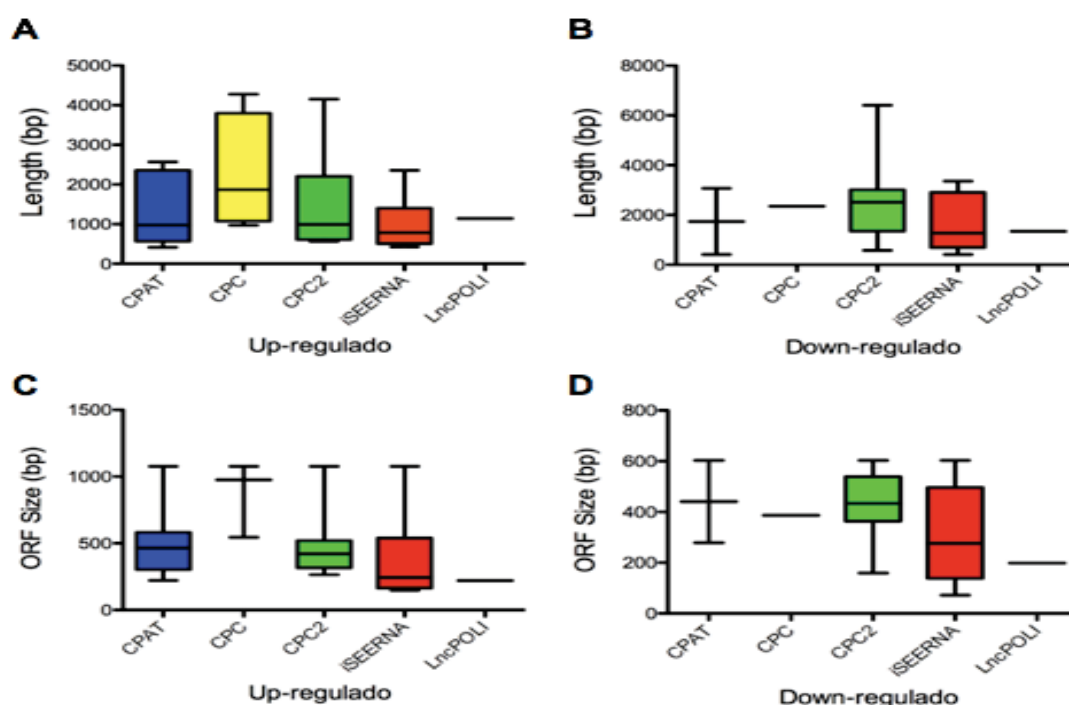


FIGURA 51: Análise dos lncRNAs diferencialmente expressos no início da adipogênese com potencial de codificar peptídeos. (A-C) Tamanho dos lncRNAs aumentados e de suas ORFs codificantes e (B-D) tamanho dos lncRNAs diminuídos e de suas ORFs codificantes. Comparação com a média de tamanho dos transcritos e das ORFs da fração polissomal (LncPOLI).

Novamente, ao analisar apenas os putativos peptídeos dos lncRNAs convergentes de todas as análises, temos o RP11-159G9.5 (358 aa), discutido anteriormente, o peptídeo derivado de SNHG7 (186 aa) mostrou identidade de 66% (cobertura de alinhamento 26%) com a proteína FAM69B de *Heterocephalus glaber* (Rato topeira-pelado). Curiosamente o SNHG7, é um lncRNA antisense que se encontra contrário ao gene codificador da proteína FAM69B em humanos (344 aa e 431 aa). Por fim o polipeptídeo derivado de DLEU2 (200 aa), o qual demonstrou identidade de 98% (cobertura de alinhamento 100%) com uma proteína predita e não caracterizada de bonobos, chimpanzés e gorilas (*Pan paniscus*, *Pan troglodytes* e *Gorilla gorilla gorilla*, respectivamente).

5 – Peptidômica

No atual trabalho, verificou-se a presença de lncRNAs associados a maquinaria traducional. Porém, pouco se compreende acerca dos mecanismos e possíveis funções destes lncRNAs associados. Uma das possibilidades,

anteriormente discutidas, seria que estes lncRNAs teriam o potencial de codificar pequenos peptídeos derivados de ORFs alternativas (pequenas e ou não convencionais). Com isso, como perspectiva futura de prosseguir investigando esse fenômeno, realizamos ensaios iniciais para padronizar um protocolo de peptidômica em células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo. A peptidômica é um braço da proteômica, onde os alvos são os pequenos fragmentos protéicos produzidos pela célula, os quais geralmente são funcionais nas células (DALLAS et al. 2015).

O protocolo foi adaptado de Slavoff et al. (2013) com algumas modificações, sendo realizado um teste para uma amostra similar a descrita no artigo supracitado (amostra HEAT) e outra amostra realizada com nosso tampão polissomal (amostra POLI). Para a amostra HEAT, as células (1×10^7) foram tripsinizadas por 5 minutos a 37°C, e então lavadas com PBS por 2 vezes. Centrifugadas a $14.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado levado a -80°C em tudo de 1,5 mL. Para a amostra POLI, as hADSC foram expandidas, sendo então, tripsinizadas por 5 minutos a 37°C e sequentemente lavadas com PBS. Aproximadamente 1×10^7 células foram ressuspensas em tampão de lise (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 0,3 M NaCl e 0,1 µg/mL cicloheximida) por 10 minutos, em gelo. Novamente, centrifugadas a $14.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante levado a -80°C em tubo de 1,5 mL. Para a próxima etapa, ambas as amostras foram processadas igualmente.

Foi adicionado 500 µL de H₂O ultra pura fervendo aos tubos, e as amostras deixadas para ferver por 15 minutos, para eliminar qualquer atividade proteolítica. Em seguida, foram sonicadas em gelo (tiros de 20 segundos/nível 4/ciclo de trabalho 40%). As amostras foram levadas a um volume de 0,25% de ácido acético e centrifugadas a $20.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C. Sendo passadas em membrana de poros de 10 kDa com os mesmos parâmetros de centrifugação. O conteúdo de proteínas e pequenos peptídeos filtrado foi avaliado através do kit Qubit™ Protein Assay (Invitrogen®), conforme recomendação dos fabricantes. E as amostras foram posteriormente desidratadas em baixa temperatura em liofilizador.

Obteve-se uma concentração protéica de 34,8 µg/mL na amostra HEAT e 68,2 µg/mL na amostra POLI. Possivelmente, nosso protocolo adaptado (amostra

POLI) teve um melhor rendimento visto que a concentração inicial das amostras foi praticamente a mesma.

Em seguida, ambas as amostras foram enviadas à plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas (ICC), decorrendo no seu processamento (tripsinizadas) e análise em espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (ThermoFisher®) pelo Dr. Michel Batista. Os dados brutos (Figura 52) foram analisados com o auxílio do Dr. Paulo de Carvalho, do laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas, através dos programas PatternLab (CARVALHO et al. 2016), um ambiente computacional integrado que analisa dados de proteômica; e DiagonoProt (SILVA et al. 2017), o qual agrupa milhões de espectros e exibe espectros de massa não identificados de alta qualidade, para identificação de novas sequências.

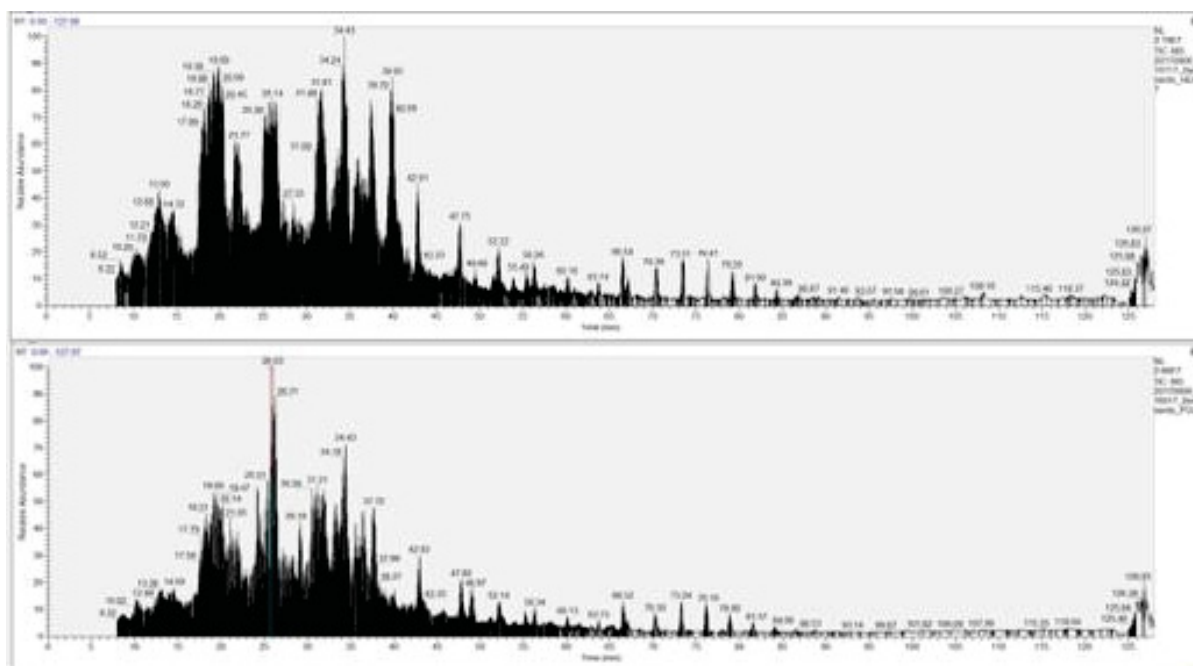


FIGURA 52: Espectros do dado bruto demonstrou peptídeos de baixo peso molecular. Em cima, amostra HEAT. Em baixo, amostra POLI.

Através do PatternLab (v4.0), na amostra HEAT foram identificadas 118 proteínas já caracterizadas, enquanto que na amostra POLI esse número foi de 120. Apenas 61 proteínas foram comuns entre os dois protocolos (Figura 53).

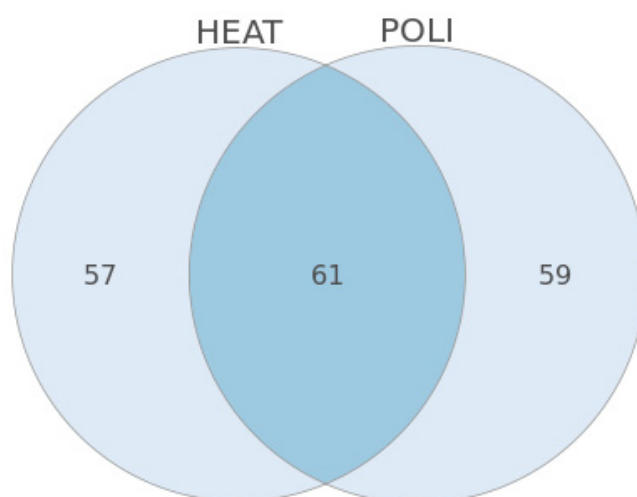


FIGURA 53: Diagrama de Venn representando os peptídeos encontrados somente na amostra HEAT (azul claro), somente na amostra POLI (azul claro) e comuns entre ambas (azul escuro).

De forma interessante, a maioria das proteínas encontradas na amostra HEAT foram de queratinas, uma proteína já bem documentada como contaminante para ensaios de espectrometria de massas (HODGE et al. 2013). Na amostra POLI, uma grande quantidade de queratinas também foi encontrada, porém diversas outras proteínas foram visualizadas, principalmente aquelas com funções no citoesqueleto (p.ex. vimentina, actina, MP4) e outras implicadas na importação mitocondrial de proteínas (HSPE1), proteínas reguladores de mRNAs (CARHSP1), proteínas ribossomais (RPS16, RPS20), dentre outras (Apêndice 14). Nos futuros experimentos, algumas precauções devem ser tomadas a fim de evitar um nível de contaminação alto.

Com isso, através do programa DiagnoProt, em análises preliminares identificamos espectros de alta qualidade nas duas amostras (Figura 54). Esses espectros não possuem anotação em nenhum banco de dados de proteínas, podendo nos indicar novos peptídeos a serem descobertos. Claramente, esta foi apenas uma padronização inicial, sendo que os futuros ensaios devem ser realizados em triplicatas biológicas e técnicas e com um maior nível de análise de dados.

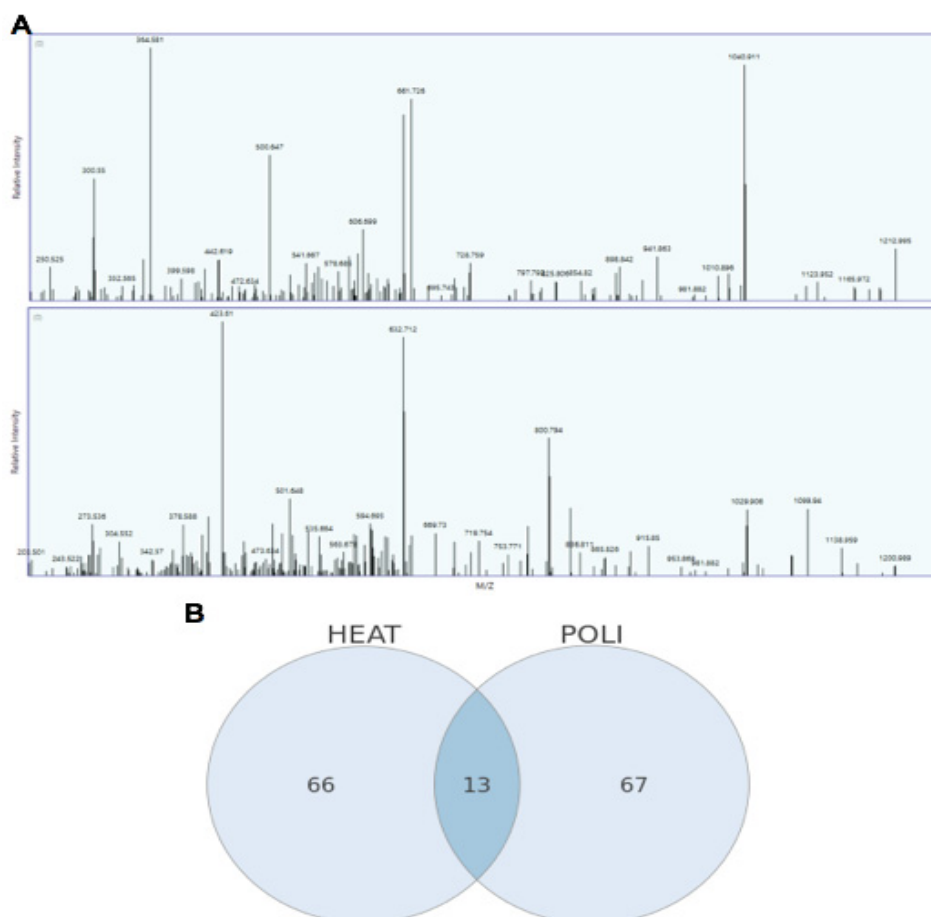


FIGURA 54: Espectros de alta qualidade não identificados em nenhum banco de dados de proteínas disponível. (A) Perfil dos espectros encontrados das amostras HEAT e POLI, respectivamente. (B) Número de espectros de alta qualidade de possíveis peptídeos não anotados.

Portanto, futuros ensaios de peptidômica associados a nossos dados RNA-seq e futuras análises de *Ribosome Profiling* (técnica que sequencia pequenos fragmentos de RNA protegidos por ribossomos) poderão lançar luz sobre o potencial dos lncRNAs de codificar pequenos peptídeos funcionais.

6 CONCLUSÕES

Ao final do presente trabalho, podemos concluir que:

1. Pode-se identificar lncRNAs diferencialmente expressos após 24 horas de indução a diferenciação adipogênica e osteogênica de células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo.
2. Os lncRNAs diferencialmente expressos foram visualizados tanto na fração total, como associados a ribossomos na fração polissomal.
3. Poucos lncRNAs diferencialmente expressos são compartilhados em ambas as frações. O que denota uma distinção em relação às possíveis funções e mecanismos de regulação dos transcritos da fração total e da fração polissomal.
4. Apenas visualizamos diferenças sutis em relação à composição e estrutura dos lncRNAs pertencentes à fração total e polissomal, não sendo, aparentemente, preponderantes para sua localização e expressão.
5. Ao compararmos os lncRNAs expressos durante o início (24h) da diferenciação osteogênica com os lncRNAs na diferenciação adipogênica, notou-se apenas uma pequena parcela de RNAs compartilhados, tanto na fração total, quanto na polissomal. Isso nos indica, que logo no início do processo de diferenciação celular de células-tronco adultas, podemos visualizar regulações distintas entre o processo de adipogênese e osteogênese, caracterizando assim um possível destino celular.
6. Alguns lncRNAs diferencialmente expressos demonstraram potencial codificador de peptídeos através de predições *in silico*.
7. Validou-se os dados de RNA-Seq, ao analisarmos alguns lncRNAs polissomais selecionados. Além de visualizarmos suas expressões durante todo o curso da diferenciação adipogênica e osteogênica.

8. Demonstramos a associação genuína destes lncRNAs selecionados a maquinaria polissomal, sendo visto através da técnica de *Polysome Profiling* com adição de puromicina.

Com estas conclusões interessantes, novas hipóteses surgiram e devem ser abordadas e estudadas. Por isso, temos como perspectiva o prosseguimento desse projeto através de uma tese de doutoramento.

Para isso, através de sequenciamento em larga escala de amostras submetidas a técnica de *Ribosome Profiling*, ensaios de peptidômica e sequenciamento por espectrometria de massas e nossos dados de RNA-Seq, temos como objetivos, identificar possíveis ORFs não convencionais em lncRNAs associados aos ribossomos, analisar a cinética traducional destes transcritos, identificar sequências peptídicas advindas de lncRNAs e se possível caracterizar e analisar esses possíveis micropeptídeos/peptídeos advindos de lncRNAs.

Além disso, através de técnicas clássicas de engenharia genética, poderemos superexpressar e silenciar alguns lncRNAs polissomais selecionados, sendo possível analisar suas influências nos processos de proliferação, migração, ciclo celular e diferenciação de células-tronco derivadas de tecido adiposo. Sendo uma das perspectivas o uso da técnica de CRISPR/Cas9 para os ensaios de nocaute de lncRNAs.

7 REFERÊNCIAS

ABDELMOHSEN K, PANDA AC, KANG MJ et al. 7SL RNA represses p53 translation by competing with HuR. *Nucleic Acids Res.* 2014: 42(15); 10099-10111.

AMÂNDIO AR, NECSULEA A, JOYE E et al. Hotair is dispensable for mouse development. *PLoS Genetics.* 2016: 12(12); e1006232.

AMIT M, DONYO M, HOLLANDER D et al. Differential GC content between exons and introns establishes distinct strategies of splice-site recognition. *Cell Reports.* 2012: 1(5); 543-556.

ANDERSON DM, ANDERSON KM, CHANGE CL, MAKAREWICH CA, NELSON BR et al. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell.* 2015: 160; 595-606.

BÁNFAI B, JIA H, KHATUN J, WOOD E, RISK B et al. Long noncoding RNAs are rarely translated in two human cell lines. *Genome Research.* 2012: 22(9); 1646-57.

BAYATI V, HASHEMITABAR M, GAZOR R et al. Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone marrow-and adipose derived-stem cells: a comparative study. *Anat Cell Biol.* 2013: 46(2); 113-121.

BERDASCO M & ESTELLER M. DNA Methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem Cell Res Ther.* 2011: 2; 42.

BERGER A & STRUB K. Multiple roles of Alu-related noncoding RNAs. *Prog Mol Subcell Biol.* 2011: 51; 119-146.

BERGHOFF EG, CLARK MF, CHEN S, CAJIGAS I et al. Evf2 (Dlx6as) lncRNA regulates ultraconserved enhancer methylation and the differential transcriptional control of adjacent genes. *Development.* 2013: 140(21); 4407-4416.

BIRNEY E, STAMATOUANNOPOULOS JA, DUTTA A et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot Project. *Nature*. 2007: 447; 799-816.

BONNET E, WUYTS J, ROUZE P e VAN DE PEER Y. Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics*. 2004: 20(17): 2911-2917.

BOYETTE, LB E TUAN, RS. Adult Stem Cells and Diseases of Aging. *Journal of Clinical Medicine*. 2014; 3(1):88-134.

BOZGEYIK E, IGCI YZ, SAMI MFJ, et al. A novel variable exonic region and differential expression of LINC00663 noncoding RNA in various câncer cell lines and normal human tissue samples. *Tumour Biol*. 2016: 37(7); 8791-8798.

BRANNAN CI, DEES EC, INGRAM RS & TILGHMAN SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol*. 1990: 20; 28-36.

BROCKDORFF N, ASHWORTH A, KAY GF et al. The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell*. 1992: 71; 515-526.

BROWN CJ, HENDRICH BD, RUPERT JL et al. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA tha contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*. 1992: 71; 527-442.

BUNNELL BA, FLAAT M, GAGLIARDI C et al. Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation. *Methods*. 2008: 45(2); 115-120.

BURTON G, NAGARAJAN R, PETERSON C et al. Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene*. 2004: 329; 167-185.

CABILI MN, TRAPNELL C, GOFF L, KOZIOL M et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011; 25; 1915-1927.

CANTILE M, GALLETTA F, FRANCO R, et al. Hyperexpression of HOXC13, located in the 12q13 chromosomal region, in well-differentiated and dedifferentiated human liposarcomas. *Oncology Reports.* 2013; 30(6); 2579-2586.

CARRIERI C, CIMATTI L, BIAGIOLI M, et al. Long Non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature.* 2012; 491(7424); 454-457.

CARVALHO PC, LIMA DB, LEPREVOST FV et al. Integrative analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nature Protocols.* 2016; 11; 102-117.

CHAE SW, JEE BK, LEE JY et al. HOX gene analysis in the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Genetics and Molecular Biology.* 2008; 31(4).

CHEN G, DENG C E LI YP. TGF-Beta and BMP signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Inter J Biol Sci.* 2012; 8:272-288.

CHNG SC, HO L, TIAN J e REVERSADE B. ELABELA: A hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Development Cell.* 2013; 27; 672-680.

CHOI HD, NOH WC, PARK JW et al. Analysis of gene expression during mineralization of cultured human periodontal ligament cells. *J Periodontal Implant Sci.* 2011; 41(1); 30-43.

COMINGS DE. The genetic organization of chromosomes. *Adv Hum Genet.* 1972; 3; 237-431.

COOPER DR, CARTER G, LI P et al. Long Noncoding RNA NEAT1 associates with SRp40 to temporally regulate PPARgamma2 splicing during adipogenesis of 3T3-L1 Cells. *Genes (Basel)*. 2014; 5(4): 1050-1063.

CORCORAN MM, HAMMARSUND M, ZHU C et al. DLEU2 encodes an antisense RNA for the putative bicistronic RFP2/LEU5 gene in humans and mouse. *Genes Chromosomes Câncer*. 2004; 40(4); 285-297.

CUI H, ZHANG Y, ZHANG Q et al. A comprehensive genome-wide analysis of long noncoding RNAs expression profile in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med*. 2017; 6(12); 2932-2941.

DA ROCHA ST, EDWARDS CA, ITO M, OGATA T, e FERGUSON-SMITH AC. Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain. *Trends Genet*. 2008; 24; 306-316.

DALLAGIOVANA B, PEREIRA IT, ORIGA-ALVES A, et al. lncRNAs are associated with polysome during adipose-derived stem cell differentiation. *Gene*. 2017; 103-111.

DALLAS DC, GUERRERO A, PARKER EA et al. Current Peptidomics: Applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. *Proteomics*. 2015; 15(0); 1026-1038.

DAVIES OG, COOPER PR, SHELTON RM et al. A comparasion of the in vitro mineralization and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Metab*. 2015; 33(4); 371-382.

DEDEIC Z, CETERA M, COHEN TV & HOLASKA JM. Emerin inhibits Lmo7 binding to the Pax3 and MyoD promoters and expression of myoblast proliferation genes. *J Cell Science*. 2011; 124; 1691-1702.

DERRIEN T, JOHNSON R, BUSSOTTI G, TANZER A, DJEBALI S, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*. 2012; 22; 1775-1789.

DESVIGNES T, CONTRERAS A & POSTLETHWAIT JH. Evolution of the miR199-214 cluster and vertebrate skeletal development. *RNA Biol*. 2014; 11(4); 281-294.

DEVESON IR, HARDWICK SA, MERCER TR & MATTICK JS. The dimensions, dynamics and relevance of the mammalian noncoding transcriptome. *Trends in Genetics*. 2017; 33(7); 464-478.

DI RUSCIO A, EBRALIDZE AK, BENOUKRAF T, AMABILE G, GOFF LA, TERRAGNI J, FIGUEROA ME, DE FIGUEIREDO PONTES LL et al. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature*. 2013; 503(7476); 371-376.

DIAZ-LAGARES A, CRUJEIRAS AB, LOPEZ-SERRA P, et al. Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human câncer. *PNAS*. 2016; 113(47); E7535-E7544.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4); 315-317.

DREHMER DL, AGUIAR AM, BRANDT AP, et al. Metabolic switches during the first steps of adipogenic stem cells differentiation. *Stem Cell Research*. 2016; 17: 413-421.

DU X, YUAN Q, QU Y et al. Endometrial Mesenchymal stem cells isolated from menstrual blood by adherence. *Stem Cells International*. 2016; ID3573846.

ELSAID MF, CHALHOUB N, BEN-OMRAN T et al. Mutation in noncoding RNA SNORD3A causes early onset cerebellar ataxia. *Annals Neurol*. 2017; 81(1): 68-78.

ESSERS PB, NONNEKENS J, GOOS YJ, BETIST MC et al. A long noncoding RNA on the Ribosome is required for lifespan extension. *Cell Reports*. 2015; 10; 339-345.

FAN Q & LIU B. Identification of a RNA-seq based 8 Long Non-coding RNA signature predicting survival in esophageal cancer. *Med Sci Monit*. 2016; 22; 5163-5172.

FATICA A & BOZZONI I. Long noncoding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Rev Genet*. 2014; 15; 7-19.

FENG J, FUNK WD, WANG SS, WEINRICH SL, AVILION AA et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995; 269; 1236-1241.

FIEDLER J, BRECKWOLDT K, REMMELE CW et al. Development of long noncoding RNA-based strategies to modulate tissue vascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 66(18): 2005-2015.

FRESE L, DIJKMAN PE & HOERSTRUP SP. Adipose tissue-derived stem cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43(4); 268-274.

FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA KV, KUROLESOVA AI et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6(2); 230-247.

FRIEDENSTEIN AJ, PIATETZKY S, PETRAKOVA KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966; 16(3); 381-390.

FUJIMOTO T & PARTON RG. Not Just Fat: The Structure and Function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3(3):a004838.

GERNAPUDI R, WOLFSON B, ZHANG Y et al. MicroRNA 140 promotes expression of lncRNA NEAT1 in adipogenesis. *Mol Cell Biol*. 2015; 36(1): 30-38.

GHASEMZADEH M, HOSSEINI E, AHMADI M et al. Comparable osteogenic capacity of mesenchymal stem or stromal cells derived from human amnion membrane and bone marrow. *Cytotechnology*. 2018: Epud.

GINGER MR, SHORE AN, CONTRERAS A et al. A noncoding RNA is a potential marker of cell fate during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103; 5781-5786.

GONG C & MAQUAT LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature*. 2011; 470(7333): 284-288.

GOTO T, LEE JY, TERAMINAMI A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *J Lipid Res*. 2011; 52; 873-884.

GOYAL A, FISKIN E, GUTSCHNER T et al. A cautionary tale of sense-antisense gene pairs: independent regulation despite inverse correlation of expression. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45(21); 12496-12508.

GRANÉLI C, THORFVE A, RUETSCHI U et al. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using quantitative proteomics approach. *Stem Cell Research*. 2014; 12(1); 153-165.

GROTTKAU BE E LIN Y. Osteogenesis of Adipose-derived Stem Cells. *Bone Research*. 2013; 2:133-145.

GUO Y, LI L, GAO J et al. miR-124 suppresses the osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and these effects are mediated through the inhibition of the JNK and p38 pathways. *Int J Mol Med*. 2017; 39(1); 71-80.

GUTTMAN M, RUSSEL P, INGOLIA NT, WEISSMAN JS, LANDER ES. Ribosome profiling provides evidence tha large noncoding RNAs do not encode proteins. *Cell*. 2014: 154(1); 240-251.

HACKETT JA & SURANI MA. Regulatory principles of pluripotency: From the ground state Up. *Cell Stem Cell*. 2014: 15; 416-430.

HAERTY W & PONTING CP. Unexpected selection to retain high GC content and splicing enhancers within exons of multiexonic lncRNA loci. *RNA*. 2015: 21: 320-332.

HANGAUER MJ, VAUGHN I & MCMANUS MT. Pervasive Transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genet*. 2013: 9(6); e1003569.

HASEGAWA D, WADA N, YOSHIDA S et al. WNT5A suppresses osteoblastic differentiation of human periodontal ligament stem-like cells via Ror2/JNK signaling. *J Cell Physiol*. 2018: 233(2); 1752-1762.

HODGE K, HAVE ST, HUTTON L & LAMOND AI. Cleaning up the masses: exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. *J Proteomics*. 2013: 88; 92-103.

HOEMANN CD, EL-GABALAWY H E MCKEE MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathology Biology*. 2009; 57(4): 318-323.

HU S, WANG X & SHAN G. Insertion of an Alu element in a lncRNA leads to primate-specific modulation of alternative splicing. *Nature Struct Mol Biol*. 2016: 23(11); 1011-1019.

HUANG G, KANG Y, HUANG Z, et al. Identification and Characterization of Long Non-coding RNAs in Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017; 42: 1037-1050.

HUANG T, JI Y, HU D, et al. SNHG8 identified as a key regulator of Epstein-barr vírus (EBV)-associated gastric câncer by an integrative analysis of lncRNA and mRNA expression.. *Oncotarget*. 2016; 7(49): 80990-81002.

HUANG Y, ZHENG Y, JIA L et al. Long Noncoding RNA H19 Promotes Osteoblast differentiation via TGF-beta1/Smad3/HDAC signaling Pathway by deriving miR-675. *Stem Cells*. 2015; 33: 3481-3492.

HUANG Y, ZHENG Y, JIN C, et al. Long Non-coding RNA H19 Inhibits Adipocyte Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through Epigenetic Modulation of Histone Deacetylases. *Scientific Reports*. 2016; 6:28897.

HUBLEY R, FINN RD, CLEMENTS J et al. The Dfam database of repetitive DNA families. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: D81-D89.

HUNG T, WANG Y, LIN MF, KOEGEL AK, KOTAKE Y et al. Extensive and coordinated Transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature Genetics*. 2011; 43; 621-629.

INGOLIA NT, BRAR GA, STERN-GINOSSAR N, HARRIS MS et al. Ribosome Profiling reveals pervasive translation outside of annotated protein-coding genes. *Cell Reports*. 2014; 8(5); 1365-1379.

INGOLIA NT, LAREAU LF & WEISSMAN. Ribosome Profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*. 2011; 147; 789-802.

JAFARI A, SIERSBAEK MS, CHEN L, et al. Pharmacological inhibition of Protein Kinase G1 enhances bone formation by human skeletal stem cells through activation of RhoA-Akt signaling. *Stem Cells*. 2015; 33(7); 2219-2231.

JI Z, SONG R, REGEV A, STRUHL K. Many lncRNAs, 5'UTRs, and pseudogenes are translated and some are likely to express functional proteins. *eLIFE*. 2015; 4; e08890.

JIA Q, CHEN X, JIANG W, et al. The regulatory effects of long noncoding RNA-ANCR on Dental Tissue-Derived Stem Cells. *Stem Cells International*. 2016; (6); 1-12.

JIA Q, JIANG W e NI L. Down-regulated non-coding RNA (lncRNA-ANCR) promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells. *Oral Biology*. 2015; 60: 234-241.

JIANG Z, JIANG C & FANG J. Up-regulated lnc-SNHG1 contributes to osteosarcoma progression through sequestration of miR-577 and activation of WNT2B/Wnt/Beta-catenin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 495(1); 238-245.

JIN C, ZHENG Y, HUANG Y, et al. Long non-coding RNA MIAT knockdown promotes osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Cell Biology International*. 2017; (41): 33-41.

JOHNSON M, ZARETSKAYA I, RAYTSELIS Y et al. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36; W5-W9.

JURKA J, KOJIMA KK & KOHANY O. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. *Mob DNA*. 2015; 6:11.

KANG D, ZHOU G, ZHOU S, et al. Comparative transcriptome analysis reveals potentially novel roles of Homeobox genes in adipose deposition in fat-tailed sheep. *Scientific Reports*. 2017; 7(1); 14491.

KANG JS, ALLISTON T, DELSTON R, et al. Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J*. 2005; 24: 2543-2555.

KANG YJ, YANG DC, KONG L et al. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res.* 2017: 45(1); W12-W16.

KANNAN S, CHERNIKOVA D, ROGOZIN IB, et al. Transposable element insertion in long intergenic noncoding RNA genes. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015: 3:71.

KARASTERGIOU K, FRIED SK, XIE H, et al. Distinct developmental signatures of human abdominal and gluteal subcutaneous adipose tissue depots. *J Clinical Endocrinol & Metab.* 2013: 98(1); 362-371.

KARLSSON O, RODOSTHENOUS RS, JARA C et al. Detection of long-noncoding RNAs in human breastmilk extracellular vesicles: Implications for early child development. *Epigenetics.* 2016: epub.

KELLEY D & RINN J. Transposable elements reveals a stem cell-specific class of long noncoding RNAs. *Genome Biology.* 2012: 13:R107.

KENIRY A, OXLEY D, MONNIER P, KYBA M, DANDOLO L et al. The H19 lncRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nature Cell Biol.* 2012: 14; 859-865.

KENT WJ, SUGNET CW, FUREY TS et al. The human genome browser at USCS. *Genome Research.* 2002: 12; 996-1006.

KERN S, EICHLER H, STOEVE J et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006: 24(5); 1294-1301.

KFOURY Y & SCADDEN DT. Mesenchymal Cells contributions to the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell.* 2015: 16(3); 239-253.

KHALIL AM, GUTTMAN M, HUARTE M, GARBER M, RAJ A et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin –modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009: 106; 11667-11672.

KIM WK, MELITON V, BOURGUARD N et al. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress. *J Cell Biochem*. 2010: 111(5); 1199-1209.

KIM YJ, BAE SW, YU SS et al. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *J Bone Miner Res*. 2009: 24(5): 816-825.

KINES KJ & BELANCIO VP. Expressing genes do not forget their LINEs: transposable elements and gene expression. *Front Biosci*. 2012: 17; 1320-1344.

KONDO T, PLAZA S, ZANET J, BENRABAH E et al. Small peptide switch the transcriptional activity of Shavenbaby during drosophila embryogenesis. *Science*. 2010: 329(5989); 336-339.

KONG L, ZHANG Y, YE QG et al. CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res*. 2007: 35; W345-W349.

KÖLLMER M, BUHRMAN JS, ZHANG Y & GEMEINHART RA. Markers are shared between adipogenic and osteogenic differentiated mesenchymal stem cells. *J Dev Biol Tissue Eng*. 2013: 5(2); 18-25.

KRETZ M, SIPRASHVILLI Z, CHU C, WEBSTER DE et al. Control of somatic tissue differentiation by the long noncoding RNA TINCR. *Nature*. 2013: 493(7431); 231-235.

KUDLA G, LIPINSKI L, CAFFIN F et al. High GC content increases mRNA levels in mammalian cells. *PLoS Biology*. 2006: 4(6); e180.

KULESSA H, TURK G & HOGAN BL. Inhibition of BMP signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *EMBO J*. 2000; 19;6664-6674.

KULTERER B, FRIEDL G, JANDROSITZ A, et al. Gene Expression Profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2007; 8:70.

LAI J, MOYA L, AN J, et al. A microsatellite repeat in PCA3 long noncoding RNA is associated with prostate cancer risk and aggressiveness. *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 16862.

LATORRE E, CARELLI S, CAREMOLI F, et al. Human antigen R binding and regulation of SOX2 mRNA in human Mesenchymal stem cells. *Mol Pharm*. 2016; 89(2): 243-252.

LAURENT, WAHLESTEDT & KAPRANOV P. The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genetics*. 2015: 1-13.

LI C, MPOLLO MSEM, GONSALVES CS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediated Transcription of miR-199a2 attenuates endothelin-1 expression via hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2014; 289(52): 36031-36047.

LI CY, WU XY, TONG JB et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6; 55.

LI Z, JIN C, CHEN S, et al. Long Non-coding RNA MEG3 inhibits adipogenesis and promotes osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-140-5p. *Molecular Cell Biochemistry*. 2017; 433(1-2); 51-60.

LIANG WC, FU WM, WANG YB et al. H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Scientific Reports*. 2016; 6:20121.

LIN J, ZHANG X, XUE C, et al. The long noncoding RNA landscape in hypoxic and inflammatory renal epithelial injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015; 309(11); F901-F913.

LIU C, CAO B, LIU N et al. Increased expression of long noncoding RNA RP11-62F24.2 in gastric cancer and its clinical significance. *Clin Lab*. 2017; 63(9); 1475-1479.

LIU X, LI D, ZHANG W, et al. Long Non-coding RNA gadd7 interacts with TDP-43 and regulates Cdk6 mRNA decay. *EMBO J*. 2012; 31(23); 4415-4427.

LORENZ R, BERNHART SH, HOENER ZU SIEDERDISSEN C et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*. 2011; 6; 26.

LUAN A, PAIK KJ, LI J, ZIELINS ER et al. RNA Sequencing for identification of differentially expressed noncoding transcripts during adipogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Plast Reconstr Surg*. 2015; 136(4); 752-763.

MA L, BAJIC VB & ZHANG Z. On the classification of long noncoding RNAs. *RNA Biology*. 2013; 10(6); 924-933.

MARCON BH, HOLETZ FB, EASTMAN G et al. Downregulation of the protein synthesis machinery is a major regulatory event during early adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Stem Cell Res*. 2017; 25: 191-201.

MARTELLO G & SMITH A. The Nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30; 647-675.

MARTIANOV J, RAMADASS A, SERRA BARROS A et al. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a noncoding interfering transcript. *Nature*. 2007: 445; 666-670.

MATSUMOTO A, PASUT A, MATSUMOTO M, YAMASHITA R, FUNG J et al. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. *Nature*. 2017: 541; 228-232.

MELÉ M & RINN JL. “Cat’s Cradling” the 3D genome by act of lncRNA Transcription. *Molecular Cell*. 2016: 62; 657-664.

MERCER TR, DINGER ME & MATTICK JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics*. 2009: 10(3); 155-159.

MERCER TR, GERHARDT DJ, DINGER ME et al. Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nature Biotechnology*. 2011: 30(1); 99-104.

MIN W, DAI D, WANG J et al. Long Noncoding RNA mir210HG as potential biomarker for the diagnosis of glioma. *PLoS ONE*. 2016: 11(9); e0160451.

MOSETI D, REGASSA A & KIM WK. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int J Mol Sci*. 2016: 17(1); 124.

MUYS BR, LORENZI JCC, ZANETTE DL, et al. Placenta-enriched lincRNAs MIR503HG and LINC00629 decrease migration and invasion potential of JEG-3 cell line. *PLoS ONE*. 2016: 11(3); e0151560.

NAVABAZAM AR, SADEGHIAN NODOSHAN F, SHEIKHHA MH et al. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iran J Reprod Med*. 2013: 11(3); 235-242.

NELSON BR, MAKAREWICH CA, ANDERSON DM, WINDERS BJ, TROUPES CD et al. A peptide encoded by transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science*. 2016: 351(6270); 271-275.

NIAZI F & VALADKHAN S. Computational analysis of functional long noncoding RNAs reveals lack of peptide-coding capacity and parallels with 3'UTR. *RNA*. 2012: 18; 825-843.

NICHOLS J & SMITH A. Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*. 2009: 4; 487-492.

NISHIZUKA M, KOYANAGI A, OSADA S, IMAGAWA M. WNT4 e WNT5A promote adipocyte differentiation. *FEBS Letters*. 2008: 3201-3205.

NORMAN JT, LINDAHL GE, SHAKIB K et al. The Y-box binding proteína YB-1 supresses collagen a1(I) gene Transcription via an evolutionary conserved regulatory element in the proximal promoter. *J Biol Chem*. 2001: 276: 29880-29890.

OLDKNOW KJ, MACRAE VE E FARQUHARSON C. Endocrine role of bone: recent and emerging perspectives beyond osteocalcin. *Journal of Endocrinology*. 2015; 225(1): R1-R19.

PANDEY RR, MONDAL T, MOHAMMAD F, ENROTH S, REDRUP et al. Kcna1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Molecular Cell*. 2008: 32; 232-246.

PAULI A, NORRIS ML, VALEN E, CHEW GL et al. Toddler: an embryonic signal tha promotes cell movement via Apelin receptors. *Science*. 2014: 343(6172); 1248636.

PELEKANOS RA, SARDESAI VS, FUTREGA K et al. Isolation and expansion of mesenchymal stem/stromal cells derived from human placenta tissue. *J Vis Exp*. 2016: (112); 54204.

PENG F, WANG R, ZHANG Y, et al. Differential expression. Analysis at the individual level reveals a lncRNA prognostic signature for lung adenocarcinoma. *Mol Câncer*. 2017: 16(1); 98.

PÉRES-SILOS V, CAMACHO-MORALES A & FUENTES-MERA L. Mesenchymal Stem Cells Subpopulations: Application for Orthopedic Regenerative Medicine. *Stem Cells International*. 2016: ID 3187491.

PINNICK KE, NICHOLSON G, MANOLOPOLOUS KN et al. Distinct development profile of lower-body adipose tissue defines resistance against obesity-associated metabolic complications. *Diabetes*. 2014: 63; 3785-3797.

PIQUES M, SCHULZE W, HOHNE M et al. Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in arabidopsis. *Mol Syst Biol*. 2009: 5; 314.

REBELATTO CK, AGUIAR AM, MORETÃO MP et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord, and adipose tissue. *Exp Biol Med*. 2008; 233(7): 901-913.

RINN JL & CHANG HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*. 2012: 81; 145-166.

RINN JL, KERTESZ M, WNAG JK, SQUAZZO SL et al. Functional demarcation of active and silente chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007: 129; 1311-1323.

ROSEN ED & MACDOUGALD OA. Adipocyte differentiation from inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006; 7:885-896.

ROSEN ED, HSU CH, WANG X, SAKAI S, FREEMAN MW, GONZALEZ FJ, SPIEGELMAN BM. C/EBPa induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*. 2002: 16(1); 22-26.

RUIZ-ORERA J, MESSEGUER X, SUBIRANA JA e ALBA MM. Long noncoding RNAs as a source of new peptides. *eLIFE*, 2014: 3; e03523.

SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, KATS L & PANDOLFI PP. A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell*. 2011: 146; 353-358.

SCHONITZER V, WIRTZ R, ULRICH V, et al. Sox2 is a potent inhibitor of osteogenic and adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Reprogram*. 2014: 16(5); 355-365.

SEFFENS W & DIGBY D. mRNAs have greater negative folding free energies than shuffled or códon choice randomized sequences. *Nucleic Acids Res*. 1999: 27(7): 1578-1584.

SHAN T, LIU W & KUANG S. Fatty acid protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in White and brown adipose tissue. *FASEB J*. 2013: 27(1); 277-287.

SHARMA S, FINDLAY M, BANDUKWALA HS, OBERDOERFFER S, BAUST B et al. Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) Transcription factor is regulated by an RNA-proteína scaffold complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011: 108; 11381-11386.

SHARMA U, PAL D & PRASAD R. Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian J Clin Biochem*. 2014: 29(3); 269-278.

SILVA ARF, LIMA DB, LEVYA A et al. DiagnoProt: a tool for Discovery of new molecules by mass spectrometry. *Bioinformatics*. 2017: 33(12); 1883-1885.

SKARIAN-AMIRI M, CRAWFORD J, FRENCH JD et al. SNORD-host RNA Zfas1 is a regulator of mammary development and a potential marker for breast câncer. *RNA*. 2011: 17(5); 878-891.

SLAVOFF SA, MITCHELL AJ, SCHWAID AG et al. Peptidomic Discovery of short open Reading frame-encoded peptides in human cells. *Nature Chemical Biology*. 2013; 9(1); 59-64.

SMITH CM & STEITZ JA. Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'terminal oligopyrimidine gene Family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol*. 1998; 18; 6897-6909.

SOLTANOFF CS, YANG S, CHEN W E LI WP. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009; 19(1):1-46.

SONG WQ, GU WQ, QIAN YB, et al. Identification of long non-coding RNA involved in osteogenic differentiation from mesenchymal stem cells using RNA-seq data. *Genetics and Molecular Research*. 2015; 14(4): 18268-18279.

SPANGENBERG L, SHIGUNOV P, ABUD APR, et al. Polysome Profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. *Stem Cell Research*. 2013; 11:902-912.

SPIGONI G, GEDRESSI C & MALLAMACI A. Regulation of Emx2 expression by antisense transcripts in murine cortico-cerebral precursors. *PLoS ONE*. 2010; 5(1); e8658.

STEIN GS E LIAN JB. Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/Differentiation Interrelationships during progressive development of the Osteoblast Phenotype. *Endocrine Reviews*. 1993; 14(4): 424-442.

SU W, XU M, CHEN X, et al. Long Noncoding RNA ZBED1-AS1 epigenetically regulates the expression of ZEB1 and downstream molecules in prostate cancer. *Mol Cancer*. 2017; 16(1): 142.

SUN K, CHEN X, JIANG P et al. iSeeRNA: identification of long intergenic non-coding RNA transcripts from transcriptome sequencing data. BMC Genomics. 2013; 14(2); S7.

TANG QQ & LANE MD. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. Annu Rev Biochem. 2012; 81:715-736.

TANI H, ONUME Y, ITO Y, et al. Long Non-coding RNAs as surrogate indicators for chemical stress responses in human-induced pluripotent stem cells. PLoS ONE. 2014; 9(8); e106282.

TAO H & HAJRI T. Very Low density lipoprotein receptor promotes adipocyte differentiation and mediates the proadipogenic effect of PPARgamma agonists. Biochem Pharmacol. 2011; 82(12); 1950-1962.

THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 282(5391); 1145-1147.

TIAN D, SUN S & LEE JT. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. Cell. 2010; 143(3); 390-403.

TICHON A, GIL N, LUBELSKY Y et al. A conserved abundant cytoplasmic long noncoding RNA modulates repression by Pumilio proteins in human cells. Nature Comm. 2016; 7; 12209.

TODOROVICH SM & KHAN ZA. Elevated T-box2 in infantile hemangioma stem cells maintains an adipogenic differentiation-competent state. Dermatoendocrinol. 2013; 5(3); 352-357.

TONTONOZ, HU & SPIEGELMAN. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated Transcription factor. Cell. 1994; 79(7); 1147-1156.

TRAPNELL C, PACHTER L, SALZBERG SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq. Bioinformatics. 2009; 25; 1105-1111.

TRIPATHI V, ELLIS JD, SHEN Z et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular Cell*. 2010: 39; 925-938.

TSUJI H, YOSHIMOTO R, HASEGAWA Y, FURUNO M, YOSHIDA M et al. Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor-1. *Genes Cells*. 2011: 16; 479-490.

TURNER DH & MATHEWS DH. NNDB: the nearest neighbor parameter database for predicting stability of nucleic acid secondary structure. *Nucleic Acids Res*. 2010: 38; D280-D282.

VAN HEESCH S, VAN ITERSON M, JACOBI J, et al. Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes. *Genome Biology*. 2014: 15(1); R6.

VOLDERS PJ, VERHEGGEN K, MENSCHAERT G et al. An update on LNCipedia: a database for annotated human lncRNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 2015: 43(1); D174-D180.

WANG H, WANG Y, XIE S, LIU Y & XIE Z. Global and cell-type specific properties of lincRNAs with Ribosome occupancy. *Nucleic Acids Res*. 2017: 45(5); 2786-2796.

WANG K, LI J, XIONG G, et al. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-196 inhibits esophageal squamous cell carcinoma growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018: 495(1); 1151-1157.

WANG K, WANG Y, LI Z, et al. Differential expression of long noncoding ribonucleic acids during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *International Orthopaedics*. 2015: 39(5); 1013-1019.

WANG KC, YANG YW, LIU B, SANYAL A et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*. 2011: 472; 120-124.

WANG L, PARK HJ, DASARI S et al. CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic Acids Res*. 2013: 41(6); e74.

WANG W, ZHAO Z, YANG F et al. An immune-related lncRNA signature for patients with anaplastic gliomas. *J Neurooncol*. 2017: epub.

WANG X, GUO B, LI Q, et al. miR-124 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nature Medicine*. 2013: 19; 93-100.

WATANABE T, SATO T, AMANO T et al. DNMT3OS, a noncoding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice. *Dev Dyn*. 2008: 237(12): 3738-48.

WESTHRIN M, XIE M, OLDEROY MO, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in mineralized alginate matrices. *PLoS ONE*. 2015: 10(3); e0120374.

WHEELER DL, CHURCH DM, FEDERHEN S et al. Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Res*. 2003: 31(1); 28-33.

WILLINGHAM AT, ORTH AP, BATALOV S, PETERS EC, WEN BG et al. A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science*. 2005: 309; 1570-1573.

YAKOVCHUK P, GOODRICH JA & KUGEL JF. B2 RNA and Alu RNA repress Transcription by disrupting contacts between RNA polymerase II and promoter DNA within assembled complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009: 106; 5569-5574.

YOON JH, ABDELMOHSEN K, SRIKANTAN S et al. LincRNA-p21 supresses target mRNA translation. *Molecular Cell*. 2012; 47(4): 648-655.

ZENG HF, QIU HY & FENG FB. Long Noncoding RNA LINC01133 sponges miR-422a to aggravate the tumorigenesis of human osteosarcoma. *Oncol Res*. 2017; epub.

ZHANG J, TAO Z & WANG Y. Long noncoding DANCR regulates the proliferation and osteogenic differentiation of human bone-derived marrow mesenchymal stem cells via the p38 MAPK pathway. *Int J Mol Med*. 2018; 41(1); 213-219.

ZHANG W, DONG R, DIAO S, et al. Differential Long Noncoding RNA/mRNA expression. Profiling and funcitonal network analysis during osteogenic differentiation of human boné marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017; 8:30.

ZHANG X, CHANG A, LI Y, GAO Y et al. miR-140-5p regulates adipocyte differentiation by targeting transforming growth factor beta signaling. *Scientific Reports*. 2015; 5; 18118.

ZHANG X, HIRAI M, CANTERO S et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2011; 112(4); 1206-1218.

ZHAO Y, LI H, FANG S, KANG Y, WU W, HAO Y et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*. 2016; 44(D1); D203-D208.

ZHU L e XU PC. Downregulated IncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating RUNX2 expression. *Biochem Biophys Res Comm*. 2013; 432(4): 612-617.

ZHU Q, LV T, WU Y et al. Long non-coding RNA 00312 regulated by HOXA5 inhibits tumor proliferation and promotes apoptosis in Non-small cell lung câncer. J Cell Mol Med. 2017: 21(9); 2184-2198.

ZHU XX, YAN YW, CHEN D, et al. Long non-coding RNA HoxA-AS3 interacts with EZH2 to regulate lineage commitment of mesenchymal stem cells. Oncotarget. 2016; 39(7): 63561-63570.

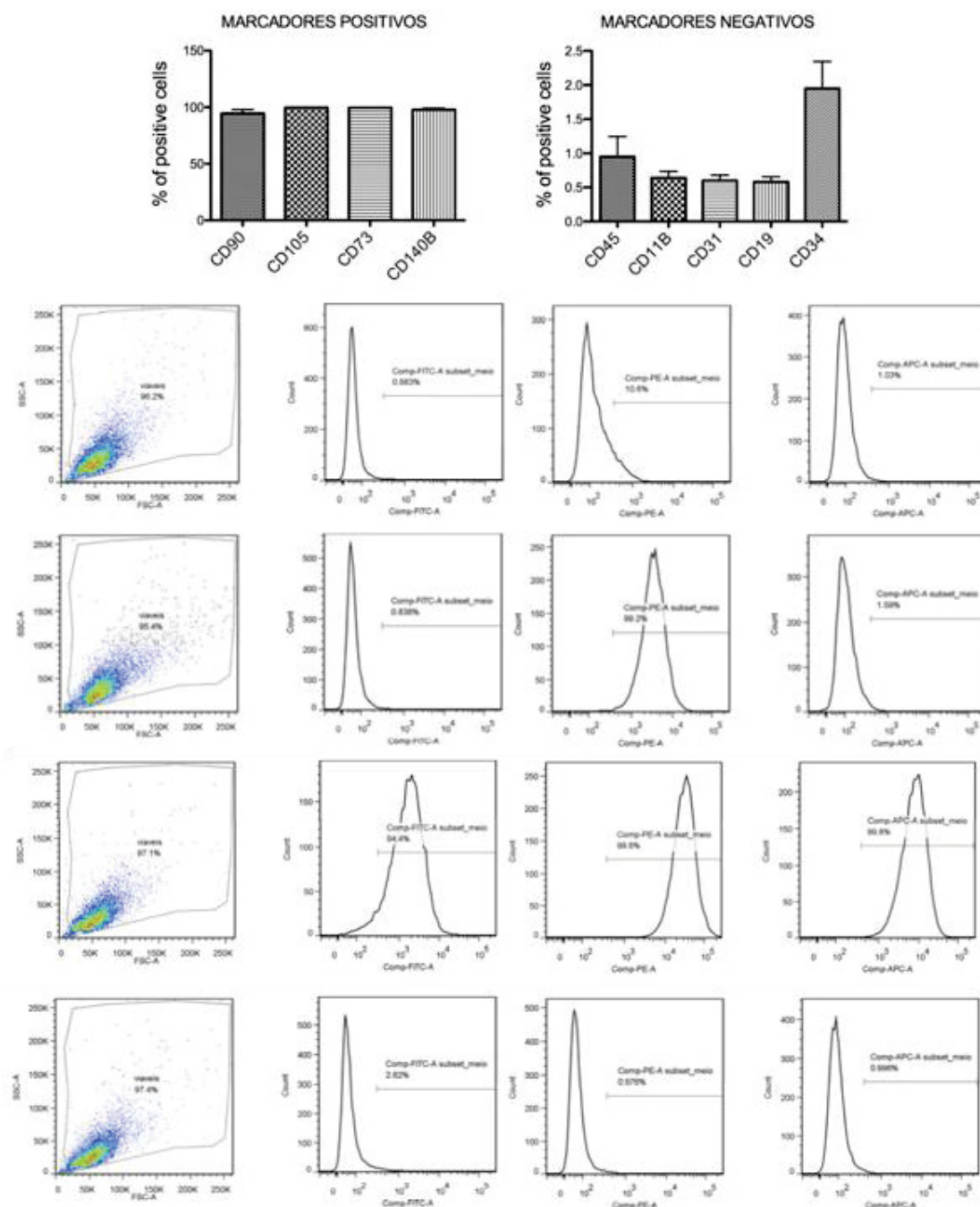
ZHUANG W, CHEN P, GE X, FU J e LI B. Upregulation of lncRNA MEG3 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from multiple myeloma by targeting BMP4 transcription. Blood. 2014: 124; 3435.

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001: 7(2); 211-228.

ZURIAGA MA, FUSTER JJ, FARB MG et al. Activation of non-canonical WNT signaling in human visceral adipose tissue contributes to local and systemic inflammation. Scientific Reports. 2017: 7(1); 17326.

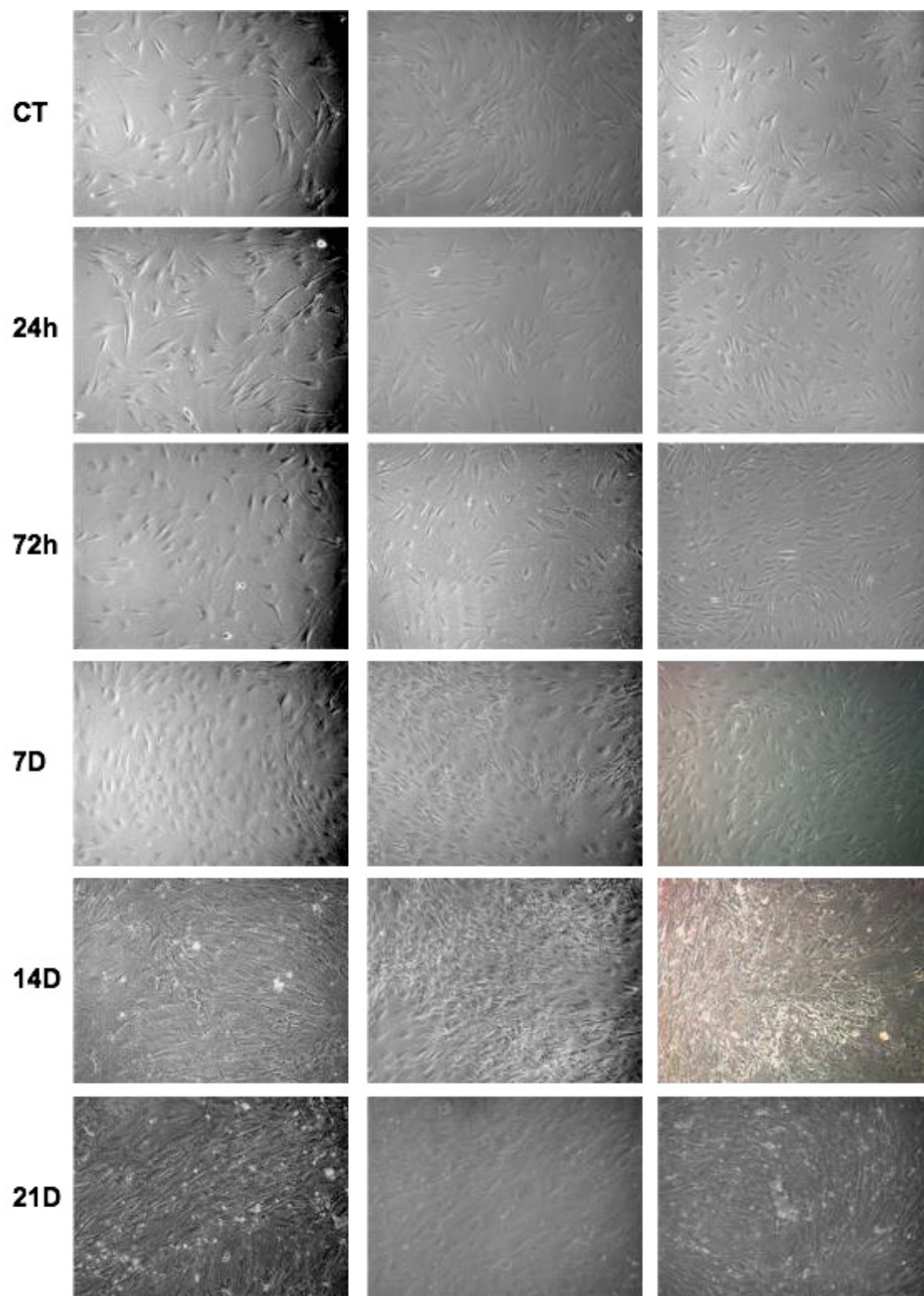
8 APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Caracterização das células-tronco derivadas de tecido adiposo por citometria de fluxo.



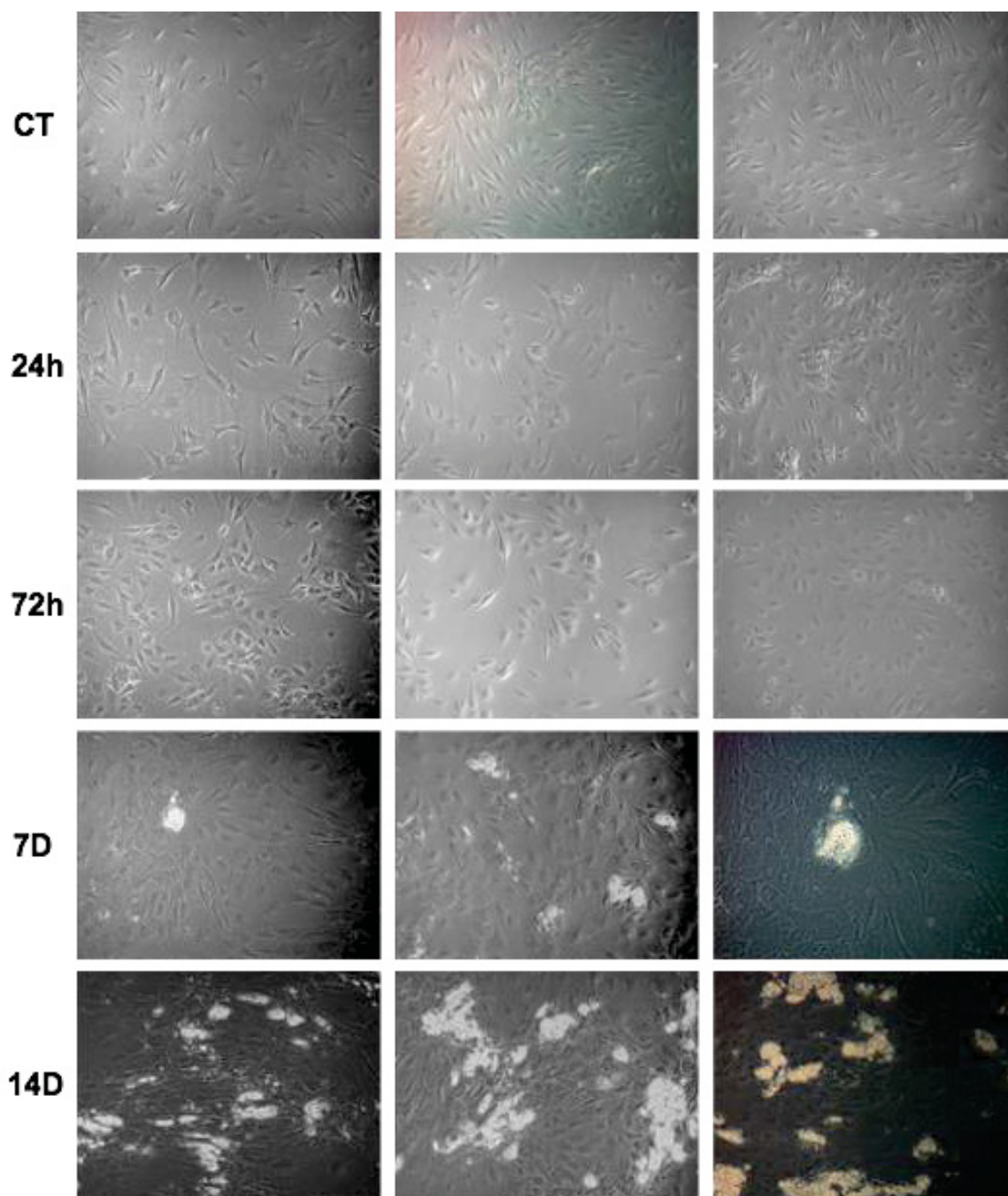
APÊNDICE 1: Média de expressão dos marcadores de células-tronco adultas de origem mesenquimal derivadas de tecido adiposo, sendo a expressão visualizada através de citometria de fluxo para os marcadores positivos: CD90, CD105, CD73 e CD140B, e para os marcadores negativos CD31, CD34, CD45, CD19 e CD11B. Gráficos representativos da análise da amostra TL02.

APÊNDICE 2.1 – Triplicata biológica da diferenciação osteogênica.



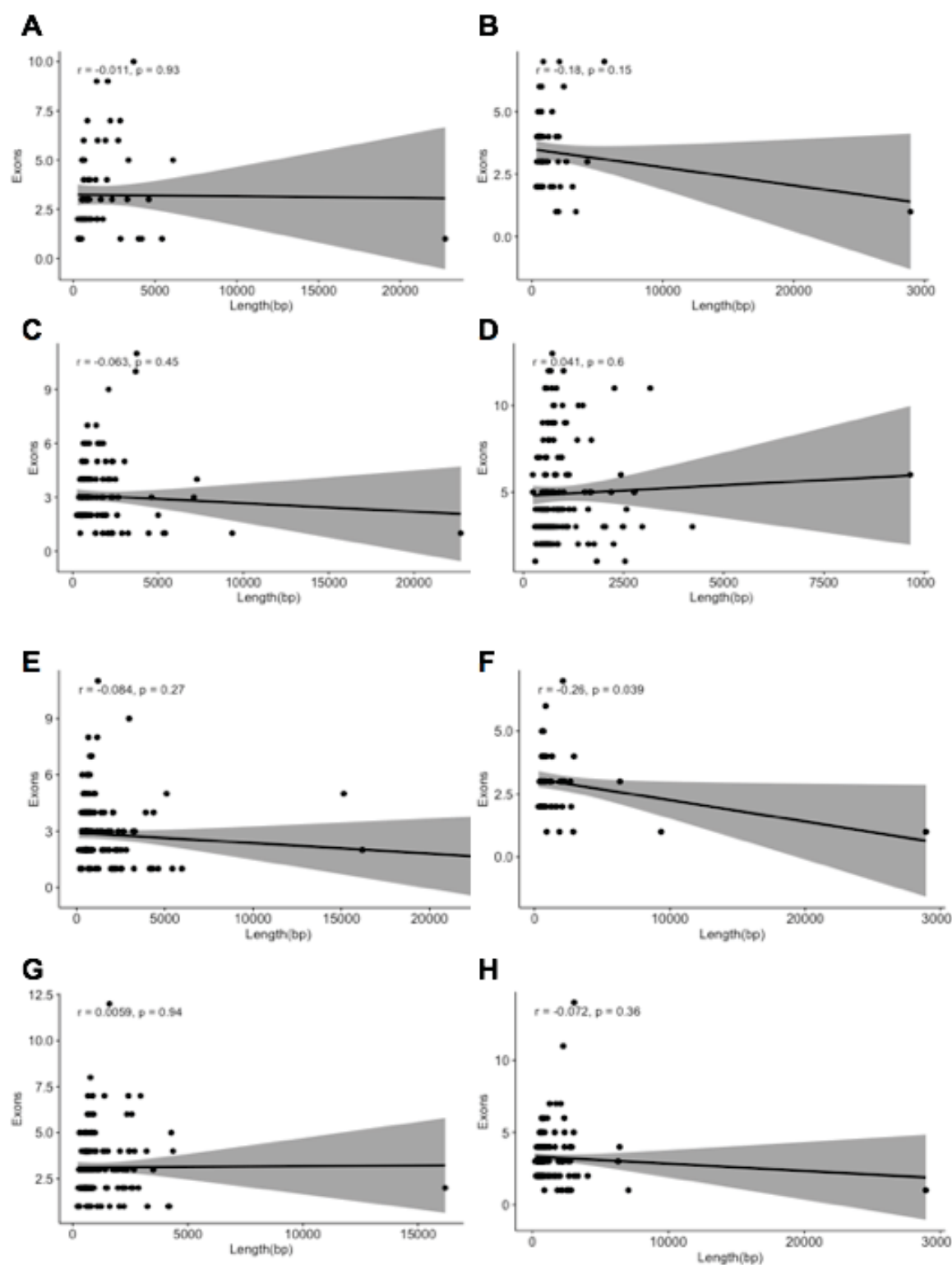
APÊNDICE 2.1 – Diferenciação de células-tronco derivadas de tecido adiposo induzidas à osteogênese.

APÊNDICE 2.2 – Triplicata biológica da diferenciação adipogênica.



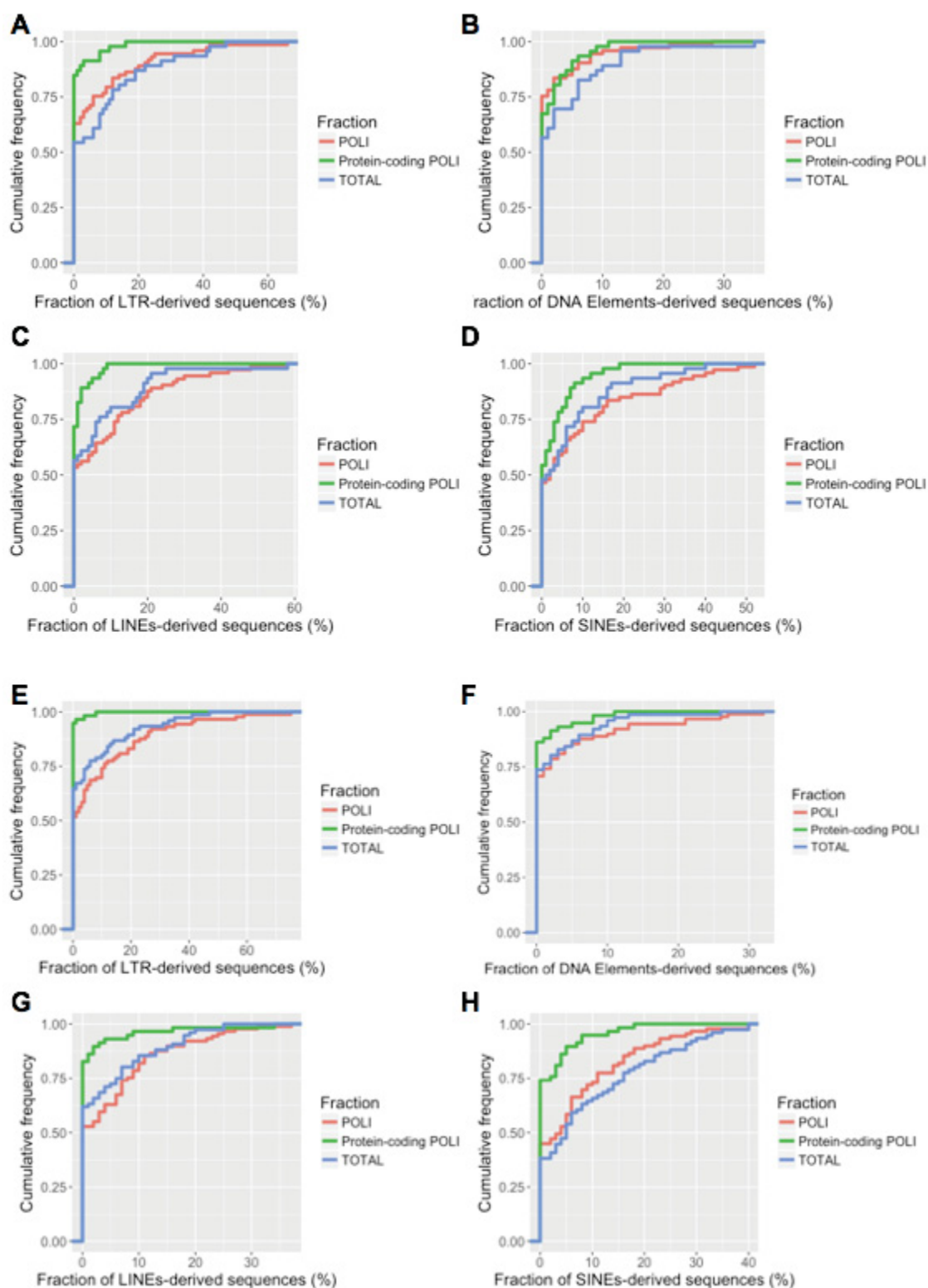
APÊNDICE 2.2 – Diferenciação de células-tronco derivadas de tecido adiposo induzidas à adipogênese.

APÊNDICE 3 – Correlação entre tamanho e número de exons de todas as frações.



APÊNDICE 3: Correlação entre o tamanho dos transcritos em relação à quantidade de exons. (A-B) lncRNAs up-regulados e down-regulados da fração total na osteogênese, (C-D) lncRNAs up-regulados e down-regulados da fração polissomal na osteogênese, (E-F) lncRNAs up-regulados e down-regulados da fração total na adipogênese e (G-H) lncRNAs up-regulados e down-regulados da fração polissomal na adipogênese.

APÊNDICE 4.1 – Elementos transponíveis dos lncRNAs e mRNA polissomais.



APÊNDICE 4.1 – Distribuição acumulada dos elementos transponíveis de lncRNAs da fração total e polissomal e mRNAs da fração polissomal. (A) LTR, (B) DNA Elements, (C) LINEs e (D) SINEs dos transcritos diferencialmente expressos na osteogênese. (E) LTR, (F) DNA Elements, (G) LINEs e (H) SINEs dos transcritos diferencialmente expressos na adipogênese.

APÊNDICE 4.2 - Significância através do teste estatístico Kolmogorov-Smirnov para elementos transponíveis.

DNA Elements	OSTEO	ADIPO
TOTAL vs. PC POLI	0,548	0,107
POLI vs. PC POLI	0,646	0,029
TOTAL vs. POLI	0,04	0,981

LTR	OSTEO	ADIPO
TOTAL vs. PC POLI	0,0001	0,0001
POLI vs. PC POLI	0,002	0,0001
TOTAL vs. POLI	0,669	0,175

LINEs	OSTEO	ADIPO
TOTAL vs. PC POLI	0,02	0,001
POLI vs. PC POLI	0,001	0,0001
TOTAL vs. POLI	0,603	0,603

SINEs	OSTEO	ADIPO
TOTAL vs. PC POLI	0,444	0,0001
POLI vs. PC POLI	0,217	0,0001
TOTAL vs. POLI	0,896	0,644

APÊNDICE 4.2: Teste estatístico relacionando lncRNAs da fração TOTAL, fração POLISSOMAL (POLI) e mRNAs da fração POLISSOMAL. Em vermelho resultados significativos ($P < 0,01$). PC = Protein Coding.

APÊNDICE 5.1 – lncRNAs antisense e seus respectivos genes codificadores de proteína da fita contrária expressos na fração total (Osteogênese)

OSTEO TOTAL	TOTAL	PROTEIN-CODING	TOTAL	TOTAL	POLI	POLI
lncRNA Antisense	Log2FC	mRNA sense	Log2FC	FDR	Log2FC	FDR
RP11-703116.1	7,08	IMPA2	2,39	2,16E-12	2,75	4,51E-11
RP11-63511.3	6,53	PALLD	1,62	9,09E-09	2,05	3,67E-09
PLCE1-AS1	6,42	PLCE1	0,44	0,35	1,40	0,001
HHIP-AS1	3,15	HHIP	0,17	0,91	0,61	0,36
RP11-366120.2	2,83	HMG2	0,0008	0,99	0,31	0,61
NAV2-AS5	2,16	NAV2	1,17	0,0009	1,91	8,14E-06
NR2F1-AS1	1,61	NR2F1	1,91	1,39E-06	2,53	6,28E-07
STARD4-AS1	-1,19	STARD4	0,75	0,19	-0,13	0,82
RP11-244F12.3	-1,43	TPM1	-0,30	0,72	-0,20	0,71
RP11-383H13.1	-1,66	MSC	-2,01	1,82E-05	-1,25	0,03
TEX26-AS1	-2,81	TEX26	ND*	ND*	ND*	ND*
RP11-336K24.12	-3,83	ARHGEF2	-2,01	2,32E-13	-1,12	0,011
RP11-36N20.1	-4,11	SMYD3	-1,95	1,27E-05	-1,97	1,69E-06

*ND= Não Demonstrado

APÊNDICE 5.2 – lncRNAs antisense e seus respectivos genes codificadores de proteína da fita contrária expressos na fração polissomal (Osteogênese)

OSTEO POLI	POLI	PROTEIN-CODING	TOTAL	TOTAL	POLI	POLI
lncRNA Antisense	Log2FC	mRNA sense	Log2FC	FDR	Log2FC	FDR
CTC-441N14.2	5,24	ZNF474	3,31	0,00	4,81	0,00
PLCE1-AS1	4,71	PLCE1	0,45	0,35	1,40	0,00
ASB16-AS1	4,36	ASB16	-1,29	0,82	ND	ND
CTD-2012K14.8	4,18	FAM65A	-0,30	0,80	0,03	0,97
RP11-703I16.1	4,16	IMPA2	2,39	0,00	2,76	0,00
HOXC13-AS	3,46	HOXC13	3,25	0,01	3,95	0,00
RP11-736K20.5	2,86	PRSS23	0,21	0,81	0,62	0,20
RP11-366L20.2	2,62	HMG2	0,00	1,00	0,31	0,62
PRKG1-AS1	2,62	PRKG1	0,06	0,95	-0,33	0,53
IL21-AS1	2,53	IL21	ND	ND	ND	ND
RP4-663N10.1	2,32	NGF	-2,39	0,00	-2,15	0,00
HHIP-AS1	2,01	HHIP	0,18	0,92	0,61	0,37
AC007620.3	1,64	GNB4	0,63	0,24	0,87	0,03
EMX2OS	1,20	EMX2	-0,16	0,84	0,40	0,43
THAP9-AS1	-1,39	THAP9	0,86	0,46	0,08	0,91
RP11-383H13.1	-1,62	MSC	-2,01	0,00	-1,25	0,03
ZFAS1	-1,69	ZNFX1	-0,03	0,97	0,73	0,15
MYHAS	-2,41	MYH2	-2,69	0,00	-2,79	0,00
VLDLR-AS1	-3,54	VLDLR	-2,12	0,00	-1,86	0,00

RP4-756G23.5	-3,82	L3MBTL2	-0,48	0,53	0,36	0,55
---------------------	-------	---------	-------	------	------	------

*ND= Não Demonstrado

APÊNDICE 5.3 – lncRNAs antisense e seus respectivos genes codificadores de proteína da fita contrária expressos na fração total (Adipogênese)

ADIPO TOTAL	TOTAL	PROTEIN-CODING	TOTAL	TOTAL	POLI	POLI
lncRNA Antisense	Log2FC	mRNA sense	Log2FC	FDR	Log2FC	FDR
AC012462.1	7,95	FN1	0,19	0,80	0,09	0,87
RP11-703116.1	7,78	IMPA2	3,20	0,00	3,06	0,00
RP11-635L1.3	7,54	PALLD	0,29	0,31	0,67	0,01
RP11-499O7.7	7,19	AKR1C2	3,52	0,00	3,55	0,00
PAPPA-AS2	6,96	PAPPA	0,98	0,00	1,12	0,00
TMEM9B-AS1	5,75	TMEM9B	0,35	0,33	0,37	0,18
PCA3	4,11	PRUNE2	2,86	0,00	2,05	0,00
HOXC13-AS	3,23	HOXC13	2,72	0,04	3,00	0,00
NAV2-AS4	3,14	NAV2	0,91	0,00	1,28	0,00
RP4-569M23.5	2,93	ZMYND8	-0,22	0,56	0,18	0,70
RP5-1112D6.8	2,89	REV3L	2,56	0,00	2,41	0,00
NAV2-AS5	2,88	NAV2	0,91	0,00	1,28	0,00
SNAI3-AS1	2,81	SNAI3	1,58	0,48	2,86	0,00
RP3-428L16.2	2,53	MAP3K4	0,25	0,45	0,10	0,76
GABPB1-AS1	2,09	GABPB1	0,53	0,07	-0,09	0,78
ZEB1-AS1	1,90	ZEB1	0,85	0,00	0,74	0,00
RP11-474P2.2	1,87	SLC38A2	0,29	0,53	-0,09	0,86

RP11-736K20.5	1,54	PRSS23	-0,16	0,72	-0,20	0,66
DNM3OS	1,22	DNM3	-0,70	0,58	-0,38	0,75
SERTAD4-AS1	-2,60	SERTAD4	-2,59	0,00	-3,12	0,00
RP11-36N20.1	-3,60	SMYD3	-0,88	0,01	-0,23	0,44
RGMB-AS1	-3,93	RGMB	-2,30	0,00	-2,31	0,00

APÊNDICE 5.4 – lncRNAs antisense e seus respectivos genes codificadores de proteína da fita contrária expressos na fração polissomal (Adipogênese)

ADIPO POLI	POLI	PROTEIN-CODING	TOTAL	TOTAL	POLI	POLI
lncRNA Antisense	Log2FC	mRNA sense	Log2FC	FDR	Log2FC	FDR
RP13-582O9.5	7,53	GLI4	-0,51	0,63	ND	ND
TBX2-AS1	4,24	TBX2	2,40	0,00	2,35	0,00
RP11-15A1.7	3,85	ZNF155	0,46	0,61	0,26	0,67
RP11-703I16.1	3,73	IMPA2	3,20	0,00	3,06	0,00
HOXC13-AS	3,10	HOXC13	2,72	0,04	3,00	0,00
RP11-736K20.5	2,76	PRSS23	-0,16	0,72	-0,20	0,66
RP11-62F24.2	2,66	BNC2	-0,08	0,84	0,18	0,61
WNT5A-AS1	2,42	WNT5A	1,84	0,00	2,02	0,00
ZNF790-AS1	2,31	ZNF790	0,96	0,05	0,86	0,02
ZBED5-AS	2,29	ZBED5	0,60	0,04	0,30	0,28
RP3-428L16.2	2,28	MAP3K4	0,25	0,45	0,10	0,76
GABPB1-AS1	2,28	GABPB1	0,53	0,07	-0,09	0,78
RP4-663N10.1	2,17	NGF	-2,70	0,00	-2,62	0,00

RP11-545E17.3	1,92	ZER1	-0,31	0,41	0,42	0,21
HOTAIR	1,91	HOXC11	0,96	0,07	0,97	0,02
MZF1-AS1	1,74	MZF1	0,21	0,75	0,34	0,61
SNHG7	1,50	FAM69B	ND	ND	ND	ND
TMCC1-AS1	1,50	TMCC1	0,34	0,40	0,12	0,76
DNM3OS	1,31	DNM3	-0,70	0,58	-0,38	0,75
DHRS4-AS1	1,27	DHRS4	0,28	0,68	0,77	0,05
LMO7-AS1	-1,54	LMO7	-1,04	0,00	-1,01	0,00
LOXL1-AS1	-1,72	LOXL1	-1,24	0,00	-0,90	0,01
LINC01024	-1,94	PURA	-0,47	0,17	-0,29	0,30
SERTAD4-AS1	-2,17	SERTAD4	-2,60	0,00	-3,12	0,00
DLEU2	-2,26	TRIM13	0,63	0,03	0,63	0,01
TMPO-AS1	-2,26	TMPO	-1,76	0,00	-1,83	0,00
RGMB-AS1	-2,79	RGMB	-2,30	0,00	-2,32	0,00
CTD-2587H24.5	-3,22	DNAAF3	ND	ND	ND	ND
MYHAS	-3,86	MYH2	-5,63	0,00	-3,72	0,00

*ND= Não Demonstrado

APÊNDICE 6.1 – 29 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000224260	RP1-272L16.1	1	39218	2	lincRNA	8,272741049	1,16E-06	1,92E-08
ENSG00000261386	CTD-2012K14.6	16	14744	2	lincRNA	7,870160628	2,50E-05	5,81E-07
ENSG00000249456	RP11-298J20.4	10	25738	1	sense_overlapping	7,282981595	0,000390332	1,27E-05
ENSG00000267480	RP11-703I16.1	18	1003	1	antisense	7,087317477	0,004078121	0,00019121
ENSG00000249609	RP11-635L1.3	4	4018	1	antisense	6,539222442	0,005825288	0,000300695
ENSG00000268894	PLCE1-AS1	10	7794	4	antisense	6,425326213	5,80E-31	5,06E-34
ENSG00000230838	AC093850.2	2	1381	1	lincRNA	5,1032338291	1,11E-05	2,44E-07
ENSG00000261578	RP11-21L23.2	11	4191	1	sense_overlapping	5,021108546	0,009346207	0,00052376
ENSG00000236882	LINC01554	5	7901	3	lincRNA	4,841940705	0,000920966	3,35E-05
ENSG00000259828	RP11-63E9.1	6	3995	1	lincRNA	4,814225316	0,005199726	0,000261583
ENSG00000266088	RP5-1028K7.2	17	9976	2	lincRNA	4,685389114	0,003399277	0,000154089
ENSG00000254987	RP11-563P16.1	11	219277	1	lincRNA	3,900949999	0,000197094	5,98E-06
ENSG00000235770	LINC00607	2	232159	6	lincRNA	3,725521086	1,16E-20	3,03E-23
ENSG00000237697	LINC00312	3	2093	1	lincRNA	3,656724337	6,89E-05	1,75E-06
ENSG00000241162	RN7SL617P	6	308	1	misc_RNA	3,461849015	8,51E-05	2,26E-06
ENSG00000278133	RP11-196G11.5	16	1829	2	sense_intronic	3,221912824	0,00198115	8,13E-05
ENSG00000248890	HHIP-AS1	4	18435	3	antisense	3,153069053	0,00803823	0,000442954
ENSG00000197301	RP11-366L20.2	12	30827	4	antisense	2,831675694	1,75E-06	3,05E-08
ENSG00000254343	RP11-760H22.2	8	4021	2	lincRNA	2,774443522	2,62E-06	4,76E-08
ENSG00000261324	RP11-174G6.5	12	5427	1	sense_overlapping	2,387092236	0,002052793	8,51E-05
ENSG00000255043	NAV2-AS5	11	4557	2	antisense	2,165662938	0,009629001	0,000543805
ENSG00000225135	RP11-361F15.2	6	2801	1	lincRNA	1,936280092	3,60E-05	8,47E-07
ENSG00000259330	INAFM2	15	1499	1	antisense	1,8922220474	9,10E-06	1,92E-07

ENSG000000237187	NR2F1-AS1	5	176289	14	antisense	1,614584131	0,00081016	2,89E-05
ENSG000000246430	LINC00968	8	63577	7	lincRNA	1,543498144	0,002558984	0,000111378
ENSG000000232855	AF131217.1	21	235502	3	lincRNA	1,423619936	0,004351336	0,000208626
ENSG000000245532	NEAT1	11	22766	5	lincRNA	1,423336804	9,22E-06	1,95E-07
ENSG000000200312	RN7SKP255	14	308	1	misc_RNA	1,159536107	0,00156742	6,14E-05
ENSG000000200488	RN7SKP203	2	332	1	misc_RNA	1,13049782	0,003575124	0,000164287

APÊNDICE 6.2 – 17 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000250038	RP11-180C1.1	4	40585	2	lincRNA	-5,470831507	0,003710598	0,000171479
ENSG00000250064	RP11-123O22.1	4	164826	1	lincRNA	-4,967432031	6,17E-06	1,23E-07
ENSG00000226876	RP11-36N20.1	1	5240	1	antisense	-4,119715493	0,002383355	0,000102101
ENSG00000273002	RP11-336K24.12	1	4187	1	antisense	-3,838110753	0,001585308	6,25E-05
ENSG00000272327	RP11-1002K11.1	8	1834	1	lincRNA	-3,616185785	9,04E-09	1,03E-10
ENSG00000223749	MIR503HG	X	3295	5	lincRNA	-3,070664928	1,04E-10	9,07E-13
ENSG00000236255	AC009404.2	2	7721	3	lincRNA	-3,004647122	0,00024527	7,56E-06
ENSG00000224743	TEX26-AS1	13	51913	17	antisense	-2,818050854	0,003503664	0,000159912
ENSG00000249378	LINC01060	4	280315	6	lincRNA	-2,138566674	0,002576485	0,000112942
ENSG00000224259	LINC01133	1	17843	3	lincRNA	-2,026413887	4,93E-12	3,44E-14
ENSG00000279095	AC092066.1	19	2027	1	TEC	-1,989135334	7,76E-05	2,02E-06
ENSG00000231290	APCDD1L-AS1	20	104509	8	processed_transcript	-1,810012104	0,000488873	1,63E-05
ENSG00000235531	RP11-383H13.1	8	290226	10	antisense	-1,66892332	6,54E-06	1,32E-07
ENSG00000259498	RP11-244F12.3	15	3353	2	antisense	-1,433946596	0,001814894	7,33E-05
ENSG00000248187	RP11-184M15.1	4	2559	1	lincRNA	-1,310858524	0,002675239	0,000118104
ENSG00000279338	RP1-309I22.2	22	28928	1	sense_overlapping	-1,256729372	0,000189099	5,71E-06
ENSG00000246859	STARD4-AS1	5	227500	2	antisense	-1,191144295	0,008197595	0,000453777

APÊNDICE 7.1 – 49 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000224260	RP1-272L16.1	1	39218	2	lincRNA	5,614469324	1,81E-07	2,60E-09
ENSG00000247311	CTC-441N14.2	5	26094	1	antisense	5,244961345	1,30E-07	1,85E-09
ENSG00000239828	RP11-446H18.5	3	109549	10	lincRNA	4,83652092	8,53E-05	2,55E-06
ENSG00000266088	RP5-1028K7.2	17	9976	2	lincRNA	4,739692288	1,63E-06	3,06E-08
ENSG00000268894	PLCE1-AS1	10	7794	4	antisense	4,706738371	2,61E-12	1,51E-14
ENSG00000225511	LINC00475	9	18816	8	lincRNA	4,615256138	0,001271843	6,39E-05
ENSG00000267080	ASB16-AS1	17	10744	5	antisense	4,361185238	0,001756141	9,26E-05
ENSG00000237697	LINC00312	3	2093	1	lincRNA	4,213961419	6,92E-05	2,00E-06
ENSG00000272053	RP11-367G6.3	6	27218	1	lincRNA	4,201425093	0,004787819	0,000311405
ENSG00000276075	CTD-2012K14.8	16	10813	2	antisense	4,176754596	0,002126739	0,000116042
ENSG00000267480	RP11-703I16.1	18	1003	1	antisense	4,156796015	0,000221785	7,88E-06
ENSG00000235770	LINC00607	2	232159	6	lincRNA	3,773802207	3,25E-19	7,38E-22
ENSG00000274627	RP11-104N10.2	16	5420	1	sense_intronic	3,653095684	0,008053756	0,000608742
ENSG00000254510	RP11-867G23.10	11	7979	3	processed_transcript	3,639001317	0,006279216	0,000439028
ENSG00000249641	HOXC13-AS	12	4315	1	antisense	3,463383923	1,82E-05	4,41E-07
ENSG00000254987	RP11-563P16.1	11	219277	1	lincRNA	3,387656726	3,45E-08	4,23E-10
ENSG00000236882	LINC01554	5	7901	3	lincRNA	3,384774282	3,00E-05	7,73E-07
ENSG00000279204	RP11-175K6.2	5	2237	1	TEC	3,34309396	0,003481061	0,00021196
ENSG00000280339	RP11-736K20.4	11	3248	1	TEC	3,222223406	9,50E-05	2,90E-06
ENSG00000255471	RP11-736K20.5	11	32823	2	antisense	2,855082052	0,000419611	1,68E-05
ENSG00000259450	RP11-265N7.1	15	5871	1	lincRNA	2,663565026	1,22E-05	2,84E-07
ENSG00000197301	RP11-366L20.2	12	30827	4	antisense	2,624186613	8,11E-08	1,11E-09
ENSG00000236671	PRKG1-AS1	10	83386	3	antisense	2,622236573	0,003704747	0,000228999
ENSG00000227145	IL21-AS1	4	70173	1	antisense	2,530996048	0,000557189	2,38E-05

ENSG000000268913	AC026806.2	19	442	1	lincRNA	2,495226595	0,007258211	0,000529479
ENSG000000245532	NEAT1	11	22766	5	lincRNA	2,413286716	8,35E-09	8,86E-11
ENSG000000259330	INAFM2	15	1499	1	antisense	2,405755155	2,73E-10	2,08E-12
ENSG000000260910	LINC00565	13	2330	1	lincRNA	2,37965217	0,000482226	1,99E-05
ENSG000000228035	RP4-663N10.1	1	85038	1	antisense	2,324578117	0,006371343	0,000447568
ENSG000000269990	CTD-3074O7.12	11	2038	1	lincRNA	2,244477619	0,003543016	0,000216667
ENSG000000245812	RP11-175K6.1	5	16995	3	lincRNA	2,196032315	0,001254708	6,27E-05
ENSG000000229729	RP11-159G9.5	3	79699	3	lincRNA	2,096907413	0,001754004	9,24E-05
ENSG000000254343	RP11-760H22.2	8	4021	2	lincRNA	2,013734809	0,003426946	0,00020731
ENSG000000248890	HHIP-AS1	4	18435	3	antisense	2,008756309	0,004765251	0,000309624
ENSG000000182165	TP53TG1	7	20290	7	lincRNA	1,921203775	0,007489598	0,000551787
ENSG000000279118	RP11-517I3.2	5	2325	1	TEC	1,861680457	0,000181307	6,21E-06
ENSG000000280143	AP000892.6	11	5325	1	TEC	1,814842486	9,70E-05	3,00E-06
ENSG000000240859	AC093627.10	7	5868	4	lincRNA	1,733966217	0,000354009	1,37E-05
ENSG000000250056	LINC01018	5	6363	4	lincRNA	1,711158496	0,002963662	0,00017284
ENSG000000272565	RP11-485G4.2	3	4451	1	lincRNA	1,6433330054	0,00056965	2,44E-05
ENSG000000242539	AC007620.3	3	2230	3	antisense	1,636763919	0,000152161	5,08E-06
ENSG000000272695	GAS6-AS2	13	2665	1	lincRNA	1,600998834	0,007996586	0,000602313
ENSG000000246430	LINC00968	8	63577	7	lincRNA	1,553782118	0,007336453	0,000536153
ENSG000000272933	RP11-47A8.5	10	1348	1	lincRNA	1,553087201	0,005811988	0,000400615
ENSG000000226950	DANCR	4	7947	5	lincRNA	1,541200477	0,001387283	7,05E-05
ENSG000000175898	CTD-2369P2.2	19	1759	2	lincRNA	1,258539906	0,004028202	0,000251646
ENSG000000130600	H19	11	6307	13	lincRNA	1,240548348	0,006993992	0,000500987
ENSG000000259758	CASC7	8	9345	1	lincRNA	1,240030166	0,009973557	0,000803142
ENSG000000229847	EMX2OS	10	71853	7	antisense	1,198913241	0,005642254	0,00038371

APÊNDICE 7.2 – 24 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000263426	RN7SL471P	6	299	1	misc_RNA	-1,028715754	0,007876701	0,000589131
ENSG00000225470	JPX	X	126084	12	lincRNA	-1,10338229	0,009832306	0,000786652
ENSG00000255717	SNHG1	11	3926	25	p_transcript	-1,1677708	0,007577614	0,000562195
ENSG00000251022	THAP9-AS1	4	7951	12	antisense	-1,390777606	0,004424006	0,000281912
ENSG00000248187	RP11-184M15.1	4	2559	1	lincRNA	-1,510095919	0,000945641	4,44E-05
ENSG00000261040	WFDC21P	17	8319	8	p_transcript	-1,578598843	0,000914916	4,26E-05
ENSG00000269893	SNHG8	4	1114	5	lincRNA	-1,579488706	2,98E-05	7,66E-07
ENSG00000232774	FLJ22447	14	88156	3	lincRNA	-1,606799555	0,005477543	0,000370704
ENSG00000235531	RP11-383H13.1	8	290226	10	antisense	-1,628253116	5,80E-05	1,65E-06
ENSG00000224032	EPB41L4A-AS1	5	3750	4	lincRNA	-1,684035609	0,000206633	7,27E-06
ENSG00000177410	ZFAS1	20	17560	10	antisense	-1,69428576	2,81E-06	5,62E-08
ENSG00000234741	GAS5	1	4982	29	p_transcript	-1,705463881	0,000127267	4,13E-06
ENSG00000261824	LINC00662	19	109360	9	lincRNA	-1,898582324	5,82E-05	1,66E-06
ENSG00000249378	LINC01060	4	280315	6	lincRNA	-1,963687166	0,004553438	0,00029256
ENSG00000224259	LINC01133	1	17843	3	lincRNA	-2,365604664	4,10E-11	2,81E-13
ENSG00000272975	MYHAS	17	240742	1	antisense	-2,410017791	0,006048143	0,000421676
ENSG00000272327	RP11-1002K11.1	8	1834	1	lincRNA	-2,618685645	0,000105657	3,32E-06
ENSG00000230623	RP11-469A15.2	1	4373	4	lincRNA	-3,31213469	0,000882625	4,09E-05
ENSG00000236404	VLDLR-AS1	9	220657	5	antisense	-3,547758998	0,000643811	2,82E-05
ENSG00000235513	RP4-756G23.5	22	8505	2	antisense	-3,828457403	0,000380989	1,50E-05
ENSG00000272341	RP1-151F17.2	6	2537	1	lincRNA	-3,891396592	0,001820137	9,70E-05
ENSG00000223749	MIR503HG	X	3295	5	lincRNA	-4,055986996	0,000375011	1,47E-05
ENSG00000231196	RP11-495P10.8	1	4969	1	lincRNA	-6,104484143	1,79E-06	3,37E-08

ENSG00000250038	RP11-180C1.1	4	40585	2	lincRNA	-8,186442541	6,90E-18	2,04E-20
-----------------	--------------	---	-------	---	---------	--------------	----------	----------

APÊNDICE 8.1 – 15 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados somente na fração TOTAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	pValue
ENSG00000261386	CTD-2012K14.6	16	14744	2	lincRNA	7,870160628	2,50E-05	5,81E-07
ENSG00000249456	RP11-298J20.4	10	25738	1	sense_overlapping	7,282981595	0,000390332	1,27E-05
ENSG00000249609	RP11-635L1.3	4	4018	1	antisense	6,539222442	0,005825288	0,000300695
ENSG00000230838	AC093850.2	2	1381	1	lincRNA	5,103238291	1,11E-05	2,44E-07
ENSG00000261578	RP11-21L23.2	11	4191	1	sense_overlapping	5,021108546	0,009346207	0,00052376
ENSG00000259828	RP11-63E9.1	6	3995	1	lincRNA	4,814225316	0,005199726	0,000261583
ENSG00000241162	RN7SL617P	6	308	1	misc_RNA	3,461849015	8,51E-05	2,26E-06
ENSG00000278133	RP11-196G11.5	16	1829	2	sense_intronic	3,221912824	0,00198115	8,13E-05
ENSG00000261324	RP11-174G6.5	12	5427	1	sense_overlapping	2,387092236	0,002052793	8,51E-05
ENSG00000255043	NAV2-AS5	11	4557	2	antisense	2,165662938	0,009629001	0,000543805
ENSG00000225135	RP11-361F15.2	6	2801	1	lincRNA	1,936280092	3,60E-05	8,47E-07
ENSG00000237187	NR2F1-AS1	5	176289	14	antisense	1,614584131	0,00081016	2,89E-05
ENSG00000232855	AF131217.1	21	235502	3	lincRNA	1,423619936	0,004351336	0,000208626
ENSG00000200312	RN7SKP255	14	308	1	misc_RNA	1,159536107	0,00156742	6,14E-05
ENSG00000200488	RN7SKP203	2	332	1	misc_RNA	1,13049782	0,003575124	0,000164287

APÊNDICE 8.2 – 10 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados somente na fração TOTAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transc.	Biotype	logFC	FDR	pValue
ENSG00000250064	RP11-123O22.1	4	164826	1	lincRNA	-4,967432031	6,17E-06	1,23E-07
ENSG00000226876	RP11-36N20.1	1	5240	1	antisense	-4,119715493	0,002383355	0,000102101
ENSG00000273002	RP11-336K24.12	1	4187	1	antisense	-3,838110753	0,001585308	6,25E-05
ENSG00000236255	AC009404.2	2	7721	3	lincRNA	-3,004647122	0,00024527	7,56E-06
ENSG00000224743	TEX26-AS1	13	51913	17	antisense	-2,818050854	0,003503664	0,000159912
ENSG00000279095	AC092066.1	19	2027	1	TEC	-1,989135334	7,76E-05	2,02E-06
ENSG00000231290	APCDD1L-AS1	20	104509	8	p_transcript	-1,810012104	0,000488873	1,63E-05
ENSG00000259498	RP11-244F12.3	15	3353	2	antisense	-1,433946596	0,001814894	7,33E-05
ENSG00000279338	RP1-309I22.2	22	28928	1	sense_overlapping	-1,256729372	0,000189099	5,71E-06
ENSG00000246859	STARD4-AS1	5	227500	2	antisense	-1,191144295	0,008197595	0,000453777

APÊNDICE 8.3 – 35 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados somente na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000247311	CTC-441N14.2	5	26094	1	antisense	5,244961345	1,30E-07	1,85E-09
ENSG00000239828	RP11-446H18.5	3	109549	10	lincRNA	4,83652092	8,53E-05	2,55E-06
ENSG00000225511	LINC00475	9	18816	8	lincRNA	4,615256138	0,001271843	6,39E-05
ENSG00000267080	ASB16-AS1	17	10744	5	antisense	4,361185238	0,001756141	9,26E-05
ENSG00000272053	RP11-367G6.3	6	27218	1	lincRNA	4,201425093	0,004787819	0,000311405
ENSG00000276075	CTD-2012K14.8	16	10813	2	antisense	4,176754596	0,002126739	0,000116042
ENSG00000274627	RP11-104N10.2	16	5420	1	sense_intronic	3,653095684	0,008053756	0,000608742
ENSG00000254510	RP11-867G23.10	11	7979	3	p_transcript	3,639001317	0,006279216	0,000439028
ENSG00000249641	HOXC13-AS	12	4315	1	antisense	3,463383923	1,82E-05	4,41E-07
ENSG00000279204	RP11-175K6.2	5	2237	1	TEC	3,34309396	0,003481061	0,00021196
ENSG00000280339	RP11-736K20.4	11	3248	1	TEC	3,222223406	9,50E-05	2,90E-06
ENSG00000255471	RP11-736K20.5	11	32823	2	antisense	2,855082052	0,000419611	1,68E-05
ENSG00000259450	RP11-265N7.1	15	5871	1	lincRNA	2,663565026	1,22E-05	2,84E-07
ENSG00000236671	PRKG1-AS1	10	83386	3	antisense	2,622236573	0,003704747	0,000228999
ENSG00000227145	IL21-AS1	4	70173	1	antisense	2,530996048	0,000557189	2,38E-05
ENSG00000268913	AC026806.2	19	442	1	lincRNA	2,495226595	0,007258211	0,000529479
ENSG00000260910	LINC00565	13	2330	1	lincRNA	2,37965217	0,000482226	1,99E-05
ENSG00000228035	RP4-663N10.1	1	85038	1	antisense	2,324578117	0,006371343	0,000447568
ENSG00000269990	CTD-3074O7.12	11	2038	1	lincRNA	2,244477619	0,003543016	0,000216667
ENSG00000245812	RP11-175K6.1	5	16995	3	lincRNA	2,196032315	0,001254708	6,27E-05
ENSG00000229729	RP11-159G9.5	3	79699	3	lincRNA	2,096907413	0,001754004	9,24E-05
ENSG00000182165	TP53TG1	7	20290	7	lincRNA	1,921203775	0,007489598	0,000551787

ENSG000000279118	RP11-517I3.2	5	2325	1	TEC	1,861680457	0,000181307	6,21E-06
ENSG000000280143	AP000892.6	11	5325	1	TEC	1,814842486	9,70E-05	3,00E-06
ENSG000000240859	AC093627.10	7	5868	4	lincRNA	1,733966217	0,000354009	1,37E-05
ENSG000000250056	LINC01018	5	6363	4	lincRNA	1,7111158496	0,002963662	0,00017284
ENSG000000272565	RP11-485G4.2	3	4451	1	lincRNA	1,6433330054	0,00056965	2,44E-05
ENSG000000242539	AC007620.3	3	2230	3	antisense	1,636763919	0,000152161	5,08E-06
ENSG000000272695	GAS6-AS2	13	2665	1	lincRNA	1,600998834	0,007996586	0,000602313
ENSG000000272933	RP11-47A8.5	10	1348	1	lincRNA	1,553087201	0,005811988	0,000400615
ENSG000000226950	DANCR	4	7947	5	lincRNA	1,541200477	0,001387283	7,05E-05
ENSG000000175898	CTD-2369P2.2	19	1759	2	lincRNA	1,258539906	0,004028202	0,000251646
ENSG000000130600	H19	11	6307	13	lincRNA	1,240548348	0,006993992	0,000500987
ENSG000000259758	CASC7	8	9345	1	lincRNA	1,240030166	0,009973557	0,000803142
ENSG000000229847	EMX2OS	10	71853	7	antisense	1,198913241	0,005642254	0,00038371

APÊNDICE 8.4 – 17 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados somente na fração POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transc.	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000263426	RN7SL471P	6	299	1	misc_RNA	-1,028715754	0,007876701	0,000589131
ENSG00000225470	JPX	X	126084	12	lincRNA	-1,10338229	0,009832306	0,000786652
ENSG00000255717	SNHG1	11	3926	25	p_transcript	-1,1677708	0,007577614	0,000562195
ENSG00000251022	THAP9-AS1	4	7951	12	antisense	-1,390777606	0,004424006	0,000281912
ENSG00000261040	WFDC21P	17	8319	8	p_transcript	-1,578598843	0,000914916	4,26E-05
ENSG00000269893	SNHG8	4	1114	5	lincRNA	-1,579488706	2,98E-05	7,66E-07
ENSG00000232774	FLJ22447	14	88156	3	lincRNA	-1,606799555	0,005477543	0,000370704
ENSG00000224032	EPB41L4A-AS1	5	3750	4	lincRNA	-1,684035609	0,000206633	7,27E-06
ENSG00000177410	ZFAS1	20	17560	10	antisense	-1,69428576	2,81E-06	5,62E-08
ENSG00000234741	GAS5	1	4982	29	p_transcript	-1,705463881	0,000127267	4,13E-06
ENSG00000261824	LINC00662	19	109360	9	lincRNA	-1,898582324	5,82E-05	1,66E-06
ENSG00000272975	MYHAS	17	240742	1	antisense	-2,410017791	0,006048143	0,000421676
ENSG00000230623	RP11-469A15.2	1	4373	4	lincRNA	-3,31213469	0,000882625	4,09E-05
ENSG00000236404	VLDLR-AS1	9	220657	5	antisense	-3,547758998	0,000643811	2,82E-05
ENSG00000235513	RP4-756G23.5	22	8505	2	antisense	-3,828457403	0,000380989	1,50E-05
ENSG00000272341	RP1-151F17.2	6	2537	1	lincRNA	-3,891396592	0,001820137	9,70E-05
ENSG00000231196	RP11-495P10.8	1	4969	1	lincRNA	-6,104484143	1,79E-06	3,37E-08

APÊNDICE 8.5 – 14 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados comuns nas frações TOTAL e POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Biotype	logFC/TOTAL	logFC/POLY	FDR/TOTAL	FDR/POLY	Pvalue/TOTAL	Pvalue/POLY
ENSG00000224260	RP1-272L16.1	lincRNA	8,272741049	5,614469324	1,16E-06	1,81E-07	1,92E-08	2,60E-09
ENSG00000267480	RP11-703I16.1	antisense	7,087317477	4,156796015	0,004078121	0,000221785	0,00019121	7,88E-06
ENSG00000268894	PLCE1-AS1	antisense	6,425326213	4,706738371	5,80E-31	2,61E-12	5,06E-34	1,51E-14
ENSG00000236882	LINC01554	lincRNA	4,841940705	3,384774282	0,000920966	3,00E-05	3,35E-05	7,73E-07
ENSG00000266088	RP5-1028K7.2	lincRNA	4,685389114	4,739692288	0,003399277	1,63E-06	0,000154089	3,06E-08
ENSG00000254987	RP11-563P16.1	lincRNA	3,900949999	3,387656726	0,000197094	3,45E-08	5,98E-06	4,23E-10
ENSG00000235770	LINC00607	lincRNA	3,725521086	3,773802207	1,16E-20	3,25E-19	3,03E-23	7,38E-22
ENSG00000237697	LINC00312	lincRNA	3,656724337	4,213961419	6,89E-05	6,92E-05	1,75E-06	2,00E-06
ENSG00000248890	HHIP-AS1	antisense	3,153069053	2,008756309	0,00803823	0,004765251	0,000442954	0,000309624
ENSG00000197301	RP11-366L20.2	antisense	2,831675694	2,624186613	1,75E-06	8,11E-08	3,05E-08	1,11E-09
ENSG00000254343	RP11-760H22.2	lincRNA	2,774443522	2,013734809	2,62E-06	0,003426946	4,76E-08	0,00020731
ENSG00000259330	INAFM2	antisense	1,892220474	2,405755155	9,10E-06	2,73E-10	1,92E-07	2,08E-12
ENSG00000246430	LINC00968	lincRNA	1,543498144	1,553782118	0,002558984	0,007336453	0,000111378	0,000536153
ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	1,423336804	2,413286716	9,22E-06	8,35E-09	1,95E-07	8,86E-11

APÊNDICE 8.6 – 7 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados comuns nas frações TOTAL e POLISSOMAL após 24h de indução osteogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Biotype	logFC/TOTAL	logFC/POLI	FDR/TOTAL	FDR/POLI	Pvalue/TOTAL	Pvalue/POL
ENSG00000250038	RP11-180C1.1	lincRNA	-5,470831507	-8,186442541	0,003710598	6,90E-18	0,000171479	2,04E-20
ENSG00000272327	RP11-1002K11.1	lincRNA	-3,616185785	-2,618685645	9,04E-09	0,00010565	1,03E-10	3,32E-06
ENSG00000223749	MIR503HG	lincRNA	-3,070664928	-4,055986996	1,04E-10	0,00037501	9,07E-13	1,47E-05
ENSG00000249378	LINC01060	lincRNA	-2,138566674	-1,963687166	0,002576485	0,00455343	0,000112942	0,00029256
ENSG00000224259	LINC01133	lincRNA	-2,026413887	-2,365604664	4,93E-12	4,10E-11	3,44E-14	2,81E-13
ENSG00000235531	RP11-383H13.1	antisense	-1,66892332	-1,628253116	6,54E-06	5,80E-05	1,32E-07	1,65E-06
ENSG00000248187	RP11-184M15.1	lincRNA	-1,310858524	-1,510095919	0,002675239	0,0009456	0,0001181	4,44E-05

APÊNDICE 9.1 – 57 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transc.	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000224260	RP1-272L16.1	1	39218	2	lincRNA	8,955363887	5,68E-13	1,16E-14
ENSG00000230695	AC012462.1	2	739	1	antisense	7,947109228	3,10E-07	1,41E-08
ENSG00000267480	RP11-703I16.1	18	1003	1	antisense	7,77883512	1,54E-05	9,72E-07
ENSG00000249609	RP11-635L1.3	4	4018	1	antisense	7,539462482	5,60E-05	4,05E-06
ENSG00000224251	RP11-499O7.7	10	1892	2	antisense	7,190360647	0,000122916	9,88E-06
ENSG00000226604	PAPPA-AS2	9	2940	1	antisense	6,961863433	0,000497208	4,65E-05
ENSG00000254860	TMEM9B-AS1	11	12852	3	antisense	5,751607721	2,17E-06	1,15E-07
ENSG00000196972	LINC000087	X	3606	1	lincRNA	5,428399447	0,000260152	2,26E-05
ENSG00000261578	RP11-21L23.2	11	4191	1	sense_overlapping	5,203461411	0,000135188	1,09E-05
ENSG00000234362	AC104654.2	2	2124	2	lincRNA	5,036223437	7,40E-11	1,98E-12
ENSG00000236882	LINC01554	5	7901	3	lincRNA	4,776794279	0,000349944	3,12E-05
ENSG00000270640	RP11-373D23.2	2	295	1	sense_intronic	4,52364266	0,009556506	0,001456369
ENSG00000225937	PCA3	9	23133	1	antisense	4,114848102	0,002610373	0,000313327
ENSG00000278309	RP11-102K13.5	13	5962	1	lincRNA	3,892403814	0,002243574	0,000260129
ENSG00000266904	LINC00663	19	19057	7	lincRNA	3,652993241	0,000437463	4,03E-05
ENSG00000256006	AC084117.3	11	1122	1	sense_intronic	3,499332193	0,006753315	0,000963873
ENSG00000262601	CTC-786C10.1	16	14087	1	lincRNA	3,318747991	0,000455787	4,24E-05
ENSG00000249641	HOXC13-AS	12	4315	1	antisense	3,23103022	0,00021886	1,86E-05
ENSG00000254622	NAV2-AS4	11	9006	1	antisense	3,13807662	0,003211767	0,000396046
ENSG00000267882	RP4-569M23.5	20	2252	1	antisense	2,934562439	0,00021278	1,81E-05
ENSG00000272356	RP5-1112D6.8	6	4314	1	antisense	2,889565245	0,004000745	0,000514329
ENSG00000261324	RP11-174G6.5	12	5427	1	sense_overlapping	2,879327015	3,74E-08	1,49E-09
ENSG00000255043	NAV2-AS5	11	4557	2	antisense	2,878817957	1,04E-06	5,20E-08
ENSG00000260630	SNAI3-AS1	16	23888	6	antisense	2,805041314	0,000460416	4,29E-05

ENSG00000257151	PWAR6	15	4617	1	lincRNA	2,769735199	0,000292297	2,56E-05
ENSG00000182165	TP53TG1	7	20290	7	lincRNA	2,596585999	0,002388938	0,000281107
ENSG00000272841	RP3-428L16.2	6	2024	1	antisense	2,532480671	4,31E-12	9,77E-14
ENSG00000245812	RP11-175K6.1	5	16995	3	lincRNA	2,500096094	0,009628664	0,001469625
ENSG00000246430	LINC00968	8	63577	7	lincRNA	2,285681326	1,15E-11	2,75E-13
ENSG00000263934	SNORD3A	17	698	3	lincRNA	2,161009187	0,004956418	0,000663196
ENSG00000244879	GABPB1-AS1	15	17243	6	antisense	2,092961103	3,39E-16	4,75E-18
ENSG00000223891	OSER1-AS1	20	15067	5	lincRNA	2,073812645	0,003263308	0,000404542
ENSG00000226950	DANCR	4	7947	5	p_transcript	2,041513896	7,99E-09	2,86E-10
ENSG00000234608	MAPKAPK5-AS1	12	3138	7	lincRNA	1,972683303	1,66E-07	7,25E-09
ENSG00000203709	C1orf132	1	67632	4	lincRNA	1,960527791	0,003443116	0,000432478
ENSG00000237036	ZEB1-AS1	10	114169	9	antisense	1,900679986	0,001162501	0,000122914
ENSG00000270022	RNU12	22	663	1	lincRNA	1,899288355	0,000299962	2,63E-05
ENSG00000258096	RP11-474P2.2	12	2315	1	antisense	1,870813577	0,000938029	9,56E-05
ENSG00000250548	RP11-47I22.2	14	14340	2	lincRNA	1,862764708	0,00937228	0,001422501
ENSG00000221949	LINC01465	12	1939	2	lincRNA	1,858219045	0,002168324	0,000250027
ENSG00000254343	RP11-760H22.2	8	4021	2	lincRNA	1,798177993	0,007112558	0,00102683
ENSG00000280339	RP11-736K20.4	11	3248	1	TEC	1,749805417	0,002060868	0,000236014
ENSG00000255471	RP11-736K20.5	11	32823	2	antisense	1,542734822	0,004920932	0,00065748
ENSG00000262074	SNORD3B-2	17	687	3	lincRNA	1,542043832	2,07E-07	9,11E-09
ENSG00000245532	NEAT1	11	22766	5	lincRNA	1,361816191	2,27E-06	1,21E-07
ENSG00000259330	INAFM2	15	1499	1	antisense	1,339595795	0,001395051	0,000151254
ENSG00000223764	RP11-54O7.3	1	4151	3	lincRNA	1,309463461	9,13E-05	7,10E-06
ENSG00000265802	RN7SL49P	13	297	1	misc_RNA	1,294355724	0,007006534	0,001009206
ENSG00000170846	AC093323.3	4	2596	3	lincRNA	1,275621896	0,002525531	0,000301487
ENSG00000224870	RP4-758J18.2	1	2524	8	p_transcript	1,265179542	0,000210163	1,78E-05
ENSG00000265185	SNORD3B-1	17	582	3	lincRNA	1,248573808	0,0024203	0,000286385

ENSG00000230630	DNM3OS	1	8263	1	antisense	1,218992047	3,53E-08	1,39E-09
ENSG00000261069	SNORD116-20	15	1235	1	lincRNA	1,218428726	0,000375992	3,39E-05
ENSG00000269936	MIR145	5	2548	1	lincRNA	1,164408698	2,00E-05	1,31E-06
ENSG00000223745	RP4-717I23.3	1	83839	24	p_transcript	1,143039974	0,00580295	0,000802349
ENSG00000212978	AC016747.3	2	3377	4	p_transcript	1,098466876	0,003218946	0,000397565
ENSG00000262202	SNORD3D	17	636	1	lincRNA	1,089315157	0,000253716	2,20E-05

APÊNDICE 9.2 – 19 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transc.	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000224259	LINC01133	1	17843	3	lincRNA	-1,199043461	1,14E-07	4,86E-09
ENSG00000259758	CASC7	8	9345	1	lincRNA	-1,218038342	4,41E-05	3,12E-06
ENSG00000248187	RP11-184M15.1	4	2559	1	lincRNA	-1,241233015	3,29E-06	1,81E-07
ENSG00000233117	LINC00702	10	42771	3	lincRNA	-1,735944891	0,005560656	0,000762283
ENSG00000172965	MIR4435-1HG	2	298750	2	lincRNA	-1,780427921	1,24E-08	4,65E-10
ENSG00000269825	CTD-3099C6.9	19	2847	1	sense_intronic	-2,13981584	0,000759659	7,50E-05
ENSG00000203706	SERTAD4-AS1	1	2591	3	antisense	-2,605112143	0,000706786	6,93E-05
ENSG00000231290	APCDD1L-AS1	20	104509	8	p_transcript	-2,650182681	1,67E-07	7,29E-09
ENSG00000280206	CTB-193M12.5	16	881	1	TEC	-2,723786952	0,000300363	2,64E-05
ENSG00000279338	RP1-309I22.2	22	28928	1	sense_overlapping	-3,230295772	1,59E-22	1,24E-24
ENSG00000239332	LINC01119	2	42310	4	lincRNA	-3,264290918	0,000993315	0,00010242
ENSG00000248698	LINC01085	4	28084	4	lincRNA	-3,40510415	9,85E-06	6,01E-07
ENSG00000226876	RP11-36N20.1	1	5240	1	antisense	-3,606694081	0,009726046	0,001486402
ENSG00000261760	RP11-1223D19.1	2	54750	5	lincRNA	-3,619557574	1,89E-06	9,99E-08
ENSG00000230417	LINC00856	10	436854	17	lincRNA	-3,78324208	0,000537573	5,09E-05
ENSG00000229563	LINC01204	X	124814	3	lincRNA	-3,877845089	0,002182248	0,000251776
ENSG00000246763	RGMB-AS1	5	3851	5	antisense	-3,930677423	3,35E-09	1,15E-10
ENSG00000272327	RP11-1002K11.1	8	1834	1	lincRNA	-4,34086442	1,30E-09	4,19E-11
ENSG00000250064	RP11-123O22.1	4	164826	1	lincRNA	-5,94676816	3,81E-08	1,52E-09

APÊNDICE 10.1 – 46 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000253716	RP13-582O9.5	8	1529	6	antisense	7,530705153	2,70E-07	1,56E-08
ENSG00000224260	RP1-272L16.1	1	39218	2	lincRNA	5,951644544	1,57E-13	3,73E-15
ENSG00000234362	AC104654.2	2	2124	2	lincRNA	4,646466402	1,25E-18	1,78E-20
ENSG00000267280	TBX2-AS1	17	18099	6	antisense	4,23752777	0,00093431	0,000121977
ENSG00000261578	RP11-21L23.2	11	4191	1	sense_overlapping	4,108329289	0,000793215	0,000100528
ENSG00000214900	C14orf182	14	25808	17	lincRNA	4,020996702	2,85E-09	1,21E-10
ENSG00000266921	RP11-15A1.7	19	5940	2	antisense	3,851683314	0,001646872	0,000233316
ENSG00000266088	RP5-1028K7.2	17	9976	2	lincRNA	3,83623786	0,00031534	3,51E-05
ENSG00000267480	RP11-703I16.1	18	1003	1	antisense	3,725218469	0,000811676	0,000103358
ENSG00000236882	LINC01554	5	7901	3	lincRNA	3,635685843	1,66E-06	1,11E-07
ENSG00000230838	AC093850.2	2	1381	1	lincRNA	3,538565494	0,000158269	1,62E-05
ENSG00000241162	RN7SL617P	6	307	1	misc_RNA	3,098909598	1,50E-05	1,22E-06
ENSG00000249641	H0XC13-AS	12	4315	1	antisense	3,098619881	4,48E-06	3,27E-07
ENSG00000259863	SH3RF3-AS1	2	1603	1	lincRNA	3,097397489	2,41E-06	1,67E-07
ENSG00000247095	MIR210HG	11	2797	4	lincRNA	2,971122156	0,007138046	0,00127942
ENSG00000280339	RP11-736K20.4	11	3248	1	TEC	2,80192607	5,12E-05	4,71E-06
ENSG00000255471	RP11-736K20.5	11	32823	2	antisense	2,755211097	4,23E-06	3,07E-07
ENSG00000255284	AP006621.5	11	6719	3	lincRNA	2,687673129	0,001779633	0,000254898
ENSG00000234779	RP11-62F24.2	9	710	1	antisense	2,661073412	5,25E-05	4,84E-06
ENSG00000244586	WNT5A-AS1	3	609	1	antisense	2,41993777	0,00051081	6,08E-05
ENSG00000267254	ZNF790-AS1	19	30597	4	antisense	2,306293369	0,002322346	0,000348204

ENSG000000247271	ZBED5-AS1	11	48543	3	antisense	2,293251778	0,00018394	1,91E-05
ENSG000000272841	RP3-428L16.2	6	2024	1	antisense	2,28002333	1,09E-14	2,31E-16
ENSG000000244879	GABPB1-AS1	15	17243	6	antisense	2,279768789	1,01E-12	2,68E-14
ENSG000000261069	SNORD116-20	15	1235	1	lincRNA	2,260101871	0,002451096	0,000369481
ENSG000000228035	RP4-663N10.1	1	85038	1	antisense	2,172479825	0,001969208	0,000288785
ENSG000000182165	TP53TG1	7	20290	7	lincRNA	1,944210954	0,000221143	2,35E-05
ENSG000000223478	RP11-545E17.3	9	8749	1	antisense	1,921926846	0,001232181	0,000166902
ENSG000000228630	HOTAIR	12	12648	5	antisense	1,914560232	0,008014335	0,001475717
ENSG000000246430	LINC00968	8	63577	7	lincRNA	1,892859691	1,66E-09	6,89E-11
ENSG000000226950	DANCR	4	7947	5	p_transcript	1,746807871	2,66E-09	1,12E-10
ENSG000000267858	MZF1-AS1	19	15668	3	antisense	1,744419028	0,00058166	7,04E-05
ENSG000000237037	NDUFA6-AS1	22	46811	16	p_transcript	1,713869561	0,0074247	0,001341753
ENSG000000223764	RP11-54O7.3	1	4151	3	lincRNA	1,667916745	3,93E-07	2,36E-08
ENSG000000245812	RP11-175K6.1	5	16995	3	lincRNA	1,577973203	0,007456883	0,001349569
ENSG000000233016	SNHG7	9	6818	4	antisense	1,502630843	5,98E-09	2,70E-10
ENSG000000271270	TMCC1-AS1	3	24704	4	antisense	1,497585315	0,000458376	5,34E-05
ENSG000000229729	RP11-159G9.5	9	79699	1	lincRNA	1,490290745	0,006384843	0,001119156
ENSG000000262202	SNORD3D	17	636	1	lincRNA	1,451212804	1,56E-05	1,28E-06
ENSG000000259330	INAFM2	15	1499	1	antisense	1,311836989	4,04E-06	2,92E-07
ENSG000000230630	DNM3OS	1	8263	1	antisense	1,274325776	1,66E-08	8,05E-10
ENSG000000235609	AF127936.7	21	63132	7	lincRNA	1,221525954	0,003196209	0,000497445
ENSG000000215256	DHRS4-AS1	14	50108	6	antisense	1,196687637	7,91E-05	7,53E-06
ENSG000000262074	SNORD3B-2	17	687	3	lincRNA	1,118423646	0,001207501	0,000163073
ENSG000000234608	MAPKAPK5-AS1	12	3138	7	lincRNA	1,067931012	1,20E-05	9,62E-07
ENSG000000224870	RP4-758J18.2	1	2524	8	p_transcript	1,023897937	0,000339301	3,81E-05

APÊNDICE 10.2 – 43 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transc.	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000260604	RP1-140K8.5	6	7059	1	lincRNA	-1,074095916	0,003393828	0,000536395
ENSG00000280123	RP11-267M23.1	8	2176	1	TEC	-1,145533634	0,005121274	0,000865737
ENSG00000223485	RP11-417E7.1	6	4832	3	lincRNA	-1,331320823	0,008289449	0,001532489
ENSG00000224259	LINC01133	1	17843	3	lincRNA	-1,377742124	2,88E-10	1,06E-11
ENSG00000248187	RP11-184M15.1	4	2559	1	lincRNA	-1,417254511	2,05E-10	7,34E-12
ENSG00000222041	LINC00152	2	151437	3	lincRNA	-1,491903526	1,39E-09	5,69E-11
ENSG00000261105	LMO7-AS1	13	31294	2	antisense	-1,542920484	0,004271745	0,000702648
ENSG00000261801	LOXL1-AS1	15	20177	13	antisense	-1,72056126	0,000118961	1,18E-05
ENSG00000261888	AC144831.1	17	2655	1	lincRNA	-1,756336808	0,00227249	0,000339053
ENSG00000234840	LINC01239	9	178013	2	lincRNA	-1,919795821	0,00550637	0,000940805
ENSG00000245146	LINC01024	5	35773	7	antisense	-1,939487163	0,00095796	0,000125647
ENSG00000172965	MIR4435-1HG	2	298750	2	lincRNA	-1,993752657	1,97E-16	3,55E-18
ENSG00000279338	RP1-309I22.2	22	28928	1	sense_overlapping	-2,053941369	0,00113715	0,000152505
ENSG00000231290	APCDD1L-AS1	20	104509	8	p_transcript	-2,133839962	2,69E-11	8,60E-13
ENSG00000203706	SERTAD4-AS1	1	2591	3	antisense	-2,172680021	4,42E-05	3,99E-06
ENSG00000270069	MIR222HG	X	25063	2	lincRNA	-2,222493747	5,35E-08	2,79E-09
ENSG00000253658	RP11-600K15.1	8	192387	4	lincRNA	-2,225066902	8,99E-05	8,66E-06
ENSG00000231607	DLEU2	13	143168	8	antisense	-2,261792544	2,82E-05	2,44E-06
ENSG00000257167	TMPO-AS1	12	3449	2	antisense	-2,263799585	0,00024767	2,67E-05
ENSG00000269825	CTD-3099C6.9	19	2847	1	sense_intronic	-2,266672232	6,10E-06	4,56E-07
ENSG00000239332	LINC01119	2	42310	4	lincRNA	-2,278719327	8,30E-06	6,40E-07
ENSG00000226380	MIR29B1	7	36501	3	lincRNA	-2,301209422	0,002818463	0,00043204

ENSG000000233117	LINC00702		10	42771	3	lincRNA	-2,302102305	1,45E-11	4,46E-13
ENSG000000267325	LINC01415		18	4994	2	lincRNA	-2,308215852	4,19E-07	2,52E-08
ENSG000000272341	RP1-151F17.2		6	2537	1	lincRNA	-2,563655137	0,0033292	0,000521492
ENSG000000246763	RGM-B-AS1		5	3851	5	antisense	-2,794201724	0,006381421	0,001118129
ENSG000000248698	LINC01085		4	28084	4	lincRNA	-2,931921964	9,19E-14	2,13E-15
ENSG000000280206	CTB-193M12.5		16	881	1	TEC	-2,93393814	1,95E-05	1,63E-06
ENSG000000272327	RP11-1002K11.1		8	1834	1	lincRNA	-2,962643524	7,01E-09	3,19E-10
ENSG000000236255	AC009404.2		2	7721	3	lincRNA	-2,985463416	4,74E-07	2,87E-08
ENSG000000250056	LINC01018		5	6363	4	lincRNA	-3,060046509	0,000709034	8,88E-05
ENSG000000233521	RP5-1172A22.1		22	3378	2	lincRNA	-3,117578013	0,001194744	0,00016111
ENSG000000267577	CTD-2587H24.5		19	18601	1	antisense	-3,218376631	0,000776407	9,80E-05
ENSG000000241288	RP11-379B18.5		3	61837	22	p_transcript	-3,255478242	0,000984443	0,000129384
ENSG000000230417	LINC00856		10	436854	17	lincRNA	-3,316000555	8,09E-08	4,38E-09
ENSG000000250303	RP11-356J5.12		11	91785	5	lincRNA	-3,338218711	1,51E-05	1,23E-06
ENSG000000223811	RP11-437J19.1		6	10941	1	lincRNA	-3,413961478	0,000111815	1,10E-05
ENSG000000229563	LINC01204	X		124814	3	lincRNA	-3,452106553	1,58E-09	6,50E-11
ENSG000000261760	RP11-1223D19.1		2	54750	5	lincRNA	-3,544444315	3,10E-13	7,62E-15
ENSG000000272975	MYHAS		17	240742	1	antisense	-3,861259734	2,10E-06	1,43E-07
ENSG000000248869	RP11-138I17.1		4	416077	2	lincRNA	-3,90458642	2,82E-07	1,63E-08
ENSG000000253161	RP11-150O12.1		8	132842	4	lincRNA	-5,832715224	1,16E-09	4,64E-11
ENSG000000250038	RP11-180C1.1		4	40585	2	lincRNA	-5,963250704	6,25E-18	9,69E-20

APÊNDICE 11.1 – 35 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados somente na fração TOTAL após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transc.	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000230695	AC012462.1	2	739	1	antisense	7,947109228	3,10E-07	1,41E-08
ENSG00000249609	RP11-635L1.3	4	4018	1	antisense	7,539462482	5,60E-05	4,05E-06
ENSG00000224251	RP11-499O7.7	10	1892	2	antisense	7,190360647	0,000122916	9,88E-06
ENSG00000226604	PAPPA-AS2	9	2940	1	antisense	6,961863433	0,000497208	4,65E-05
ENSG00000254860	TMEM9B-AS1	11	12852	3	antisense	5,751607721	2,17E-06	1,15E-07
ENSG00000196972	LINC00087	X	3606	1	lincRNA	5,428399447	0,000260152	2,26E-05
ENSG00000270640	RP11-373D23.2	2	295	1	sense_intronic	4,52364266	0,009556506	0,001456369
ENSG00000225937	PCA3	9	23133	1	antisense	4,114848102	0,002610373	0,000313327
ENSG00000278309	RP11-102K13.5	13	5962	1	lincRNA	3,892403814	0,002243574	0,000260129
ENSG00000266904	LINC00663	19	19057	7	lincRNA	3,652993241	0,000437463	4,03E-05
ENSG00000256006	AC084117.3	11	1122	1	sense_intronic	3,499332193	0,006753315	0,000963873
ENSG00000262601	CTC-786C10.1	16	14087	1	lincRNA	3,318747991	0,000455787	4,24E-05
ENSG00000254622	NAV2-AS4	11	9006	1	antisense	3,13807662	0,003211767	0,000396046
ENSG00000267882	RP4-569M23.5	20	2252	1	antisense	2,934562439	0,00021278	1,81E-05
ENSG00000272356	RP5-1112D6.8	6	4314	1	antisense	2,889565245	0,004000745	0,000514329
ENSG00000261324	RP11-174G6.5	12	5427	1	sense_overlapping	2,879327015	3,74E-08	1,49E-09
ENSG00000255043	NAV2-AS5	11	4557	2	antisense	2,878817957	1,04E-06	5,20E-08
ENSG00000260630	SNAI3-AS1	16	23888	6	antisense	2,805041314	0,000460416	4,29E-05
ENSG00000257151	PWAR6	15	4617	1	lincRNA	2,769735199	0,000292297	2,56E-05
ENSG00000263934	SNORD3A	17	698	3	lincRNA	2,161009187	0,004956418	0,000663196
ENSG00000223891	OSER1-AS1	20	15067	5	lincRNA	2,073812645	0,003263308	0,000404542
ENSG00000203709	C1orf132	1	67632	4	lincRNA	1,960527791	0,003443116	0,000432478

ENSG000000237036	ZEB1-AS1		10	114169	9	antisense	1,900679986	0,001162501	0,000122914
ENSG000000270022	RNU12		22	663	1	lincRNA	1,899288355	0,000299962	2,63E-05
ENSG000000258096	RP11-474P2.2		12	2315	1	antisense	1,870813577	0,000938029	9,56E-05
ENSG000000250548	RP11-47122.2		14	14340	2	lincRNA	1,862764708	0,00937228	0,001422501
ENSG000000221949	LINC01465		12	1939	2	lincRNA	1,858219045	0,002168324	0,000250027
ENSG000000254343	RP11-760H22.2		8	4021	2	lincRNA	1,798177993	0,007112558	0,00102683
ENSG000000245532	NEAT1		11	22766	5	lincRNA	1,361816191	2,27E-06	1,21E-07
ENSG000000265802	RN7SL49P		13	297	1	misc_RNA	1,294355724	0,007006534	0,001009206
ENSG000000170846	AC093323.3		4	2596	3	lincRNA	1,275621896	0,002525531	0,000301487
ENSG000000265185	SNORD3B-1		17	582	3	lincRNA	1,248573808	0,0024203	0,000286385
ENSG000000269936	MIR145		5	2548	1	lincRNA	1,164408698	2,00E-05	1,31E-06
ENSG000000223745	RP4-717I23.3		1	83839	24	p_transcript	1,143039974	0,00580295	0,000802349
ENSG000000212978	AC016747.3		2	3377	4	p_transcript	1,098466876	0,003218946	0,000397565

APÊNDICE 11.2 – 3 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados somente na fração TOTAL após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transc.	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000259758	CASC7	8	9345	1	lincRNA	-1,218038342	4,41E-05	3,12E-06
ENSG00000226876	RP11-36N20.1	1	5240	1	antisense	-3,606694081	0,009726046	0,001486402
ENSG00000250064	RP11-123O22.1	4	164826	1	lincRNA	-5,94676816	3,81E-08	1,52E-09

APÊNDICE 11.3 – 24 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados somente na fração POLISSOMAL após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transc.	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000253716	RP13-58209.5	8	1529	6	antisense	7,530705153	2,70E-07	1,56E-08
ENSG00000267280	TBX2-AS1	17	18099	6	antisense	4,23752777	0,00093431	0,000121977
ENSG00000214900	C14orf182	14	25808	17	lincRNA	4,020996702	2,85E-09	1,21E-10
ENSG00000266921	RP11-15A1.7	19	5940	2	antisense	3,851683314	0,001646872	0,000233316
ENSG00000266088	RP5-1028K7.2	17	9976	2	lincRNA	3,83623786	0,00031534	3,51E-05
ENSG00000230838	AC093850.2	2	1381	1	lincRNA	3,538565494	0,000158269	1,62E-05
ENSG00000241162	RN7SL617P	6	307	1	misc_RNA	3,098909598	1,50E-05	1,22E-06
ENSG00000259863	SH3RF3-AS1	2	1603	1	lincRNA	3,097397489	2,41E-06	1,67E-07
ENSG00000247095	MIR210HG	11	2797	4	lincRNA	2,971122156	0,007138046	0,00127942
ENSG00000255284	AP006621.5	11	6719	3	lincRNA	2,687673129	0,001779633	0,000254898
ENSG00000234779	RP11-62F24.2	9	710	1	antisense	2,661073412	5,25E-05	4,84E-06
ENSG00000244586	WNT5A-AS1	3	609	1	antisense	2,41993777	0,00051081	6,08E-05
ENSG00000267254	ZNF790-AS1	19	30597	4	antisense	2,306293369	0,002322346	0,000348204
ENSG00000247271	ZBED5-AS1	11	48543	3	antisense	2,293251778	0,00018394	1,91E-05
ENSG00000228035	RP4-663N10.1	1	85038	1	antisense	2,172479825	0,001969208	0,000288785
ENSG00000223478	RP11-545E17.3	9	8749	1	antisense	1,921926846	0,001232181	0,000166902
ENSG00000228630	HOTAIR	12	12648	5	antisense	1,914560232	0,008014335	0,001475717
ENSG00000267858	MZF1-AS1	19	15668	3	antisense	1,744419028	0,00058166	7,04E-05
ENSG00000237037	NDUFA6-AS1	22	46811	16	p_transcript	1,713869561	0,0074247	0,001341753
ENSG00000233016	SNHG7	9	6818	4	antisense	1,502630843	5,98E-09	2,70E-10
ENSG00000271270	TMCC1-AS1	3	24704	4	antisense	1,497585315	0,000458376	5,34E-05
ENSG00000229729	RP11-159G9.5	9	79699	1	lincRNA	1,490290745	0,006384843	0,001119156
ENSG00000235609	AF127936.7	21	63132	7	lincRNA	1,221525954	0,003196209	0,000497445

ENSG00000215256	DHRS4-AS1	14	50108	6	antisense	1,196687637	7,91E-05	7,53E-06
-----------------	-----------	----	-------	---	-----------	-------------	----------	----------

APÊNDICE 11.4 – 27 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados somente na fração POLISSOMAL após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000260604	RP1-140K8.5	6	7059	1	lincRNA	-1,074095916	0,003393828	0,000536395
ENSG00000280123	RP11-267M23.1	8	2176	1	TEC	-1,145533634	0,005121274	0,000865737
ENSG00000223485	RP11-417E7.1	6	4832	3	lincRNA	-1,331320823	0,008289449	0,001532489
ENSG00000222041	LINC00152	2	151437	3	lincRNA	-1,491903526	1,39E-09	5,69E-11
ENSG00000261105	LMO7-AS1	13	31294	2	antisense	-1,542920484	0,004271745	0,000702648
ENSG00000261801	LOXL1-AS1	15	20177	13	antisense	-1,72056126	0,000118961	1,18E-05
ENSG00000261888	AC144831.1	17	2655	1	lincRNA	-1,756336808	0,00227249	0,000339053
ENSG00000234840	LINC01239	9	178013	2	lincRNA	-1,919795821	0,00550637	0,000940805
ENSG00000245146	LINC01024	5	35773	7	antisense	-1,939487163	0,00095796	0,000125647
ENSG00000270069	MIR222HG	X	25063	2	lincRNA	-2,222493747	5,35E-08	2,79E-09
ENSG00000253658	RP11-600K15.1	8	192387	4	lincRNA	-2,225066902	8,99E-05	8,66E-06
ENSG00000231607	DLEU2	13	143168	8	antisense	-2,261792544	2,82E-05	2,44E-06
ENSG00000257167	TMPO-AS1	12	3449	2	antisense	-2,263799585	0,00024767	2,67E-05
ENSG00000226380	MIR29B1	7	36501	3	lincRNA	-2,301209422	0,002818463	0,00043204
ENSG00000267325	LINC01415	18	4994	2	lincRNA	-2,308215852	4,19E-07	2,52E-08
ENSG00000272341	RP1-151F17.2	6	2537	1	lincRNA	-2,563655137	0,0033292	0,000521492
ENSG00000236255	AC009404.2	2	7721	3	lincRNA	-2,985463416	4,74E-07	2,87E-08
ENSG00000250056	LINC01018	5	6363	4	lincRNA	-3,060046509	0,000709034	8,88E-05

ENSG000000233521	RP5-1172A22.1	22	3378	2	lincRNA	-3,117578013	0,001194744	0,00016111
ENSG000000267577	CTD-2587H24.5	19	18601	1	antisense	-3,218376631	0,000776407	9,80E-05
ENSG000000241288	RP11-379B18.5	3	61837	22	p_transcript	-3,255478242	0,000984443	0,000129384
ENSG000000250303	RP11-356J5.12	11	91785	5	lincRNA	-3,338218711	1,51E-05	1,23E-06
ENSG000000223811	RP11-437J19.1	6	10941	1	lincRNA	-3,413961478	0,000111815	1,10E-05
ENSG000000272975	MYHAS	17	240742	1	antisense	-3,861259734	2,10E-06	1,43E-07
ENSG000000248869	RP11-138I17.1	4	416077	2	lincRNA	-3,90458642	2,82E-07	1,63E-08
ENSG000000253161	RP11-150O12.1	8	132842	4	lincRNA	-5,832715224	1,16E-09	4,64E-11
ENSG000000250038	RP11-180C1.1	4	40585	2	lincRNA	-5,963250704	6,25E-18	9,69E-20

APÊNDICE 11.5 – 22 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados comuns nas frações TOTAL e POLISSOMA após 24h de indução adipogênica.

logFC/								
Ensembl_gene_id	Gene.ID	Biotype	TOTAL	logFC/POLI	FDR/TOTAL	FDR/POLI	Pvalue/TOTAL	Pvalue/POLI
ENSG00000224260	RP1-272L16.1	lincRNA	8,955	5,951644544	5,68E-13	1,57E-13	1,16E-14	3,73E-15
ENSG00000267480	RP11-703I16.1	antisense	7,778	3,725218469	1,54E-05	0,000811676	9,72E-07	0,000103358
ENSG00000261578	RP11-21L23.2	sense_overlapping	5,203	4,108329289	0,000135188	0,000793215	1,09E-05	0,000100528
ENSG00000234362	AC104654.2	lincRNA	5,036	4,646466402	7,40E-11	1,25E-18	1,98E-12	1,78E-20
ENSG00000236882	LINC01554	lincRNA	4,776	3,635685843	0,000349944	1,66E-06	3,12E-05	1,11E-07
ENSG00000249641	HOXC13-AS	antisense	3,231	3,098619881	0,00021886	4,48E-06	1,86E-05	3,27E-07
ENSG00000182165	TP53TG1	lincRNA	2,596	1,944210954	0,002388938	0,000221143	0,000281107	2,35E-05
ENSG00000272841	RP3-428L16.2	antisense	2,532	2,28002333	4,31E-12	1,09E-14	9,77E-14	2,31E-16
ENSG00000246430	LINC00968	lincRNA	2,285	1,892859691	1,15E-11	1,66E-09	2,75E-13	6,89E-11
ENSG00000245812	RP11-175K6.1	lincRNA	2,500	1,577973203	0,009628664	0,007456883	0,001469625	0,001349569
ENSG00000244879	GABPB1-AS1	antisense	2,092	2,279768789	3,39E-16	1,01E-12	4,75E-18	2,68E-14
ENSG00000226950	DANCR	p_transcript	2,041	1,746807871	7,99E-09	2,66E-09	2,86E-10	1,12E-10
ENSG00000280339	RP11-736K20.4	TEC	1,749	2,80192607	0,002060868	5,12E-05	0,000236014	4,71E-06
ENSG00000255471	RP11-736K20.5	antisense	1,542	2,755211097	0,004920932	4,23E-06	0,00065748	3,07E-07
ENSG00000234608	MAPKAPK5-AS1	lincRNA	1,972	1,067931012	1,66E-07	1,20E-05	7,25E-09	9,62E-07
ENSG00000261069	SNORD116-20	lincRNA	1,218	2,260101871	0,000375992	0,002451096	3,39E-05	0,000369481
ENSG00000223764	RP11-54O7.3	lincRNA	1,921	1,667916745	0,001232181	3,93E-07	0,000166902	2,36E-08
ENSG00000262202	SNORD3D	lincRNA	1,451	1,451212804	1,56E-05	1,56E-05	1,28E-06	1,28E-06
ENSG00000259330	INAFM2	antisense	1,339	1,311836989	0,001395051	4,04E-06	0,000151254	2,92E-07
ENSG00000230630	DNM3OS	antisense	1,218	1,274325776	3,53E-08	1,66E-08	1,39E-09	8,05E-10
ENSG00000262074	SNORD3B-2	lincRNA	1,542	1,118423646	2,07E-07	0,001207501	9,11E-09	0,000163073
ENSG00000224870	RP4-758J18.2	p_transcript	1,143	1,023897937	0,00580295	0,000339301	0,000802349	3,81E-05

APÊNDICE 11.6 – 16 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados comuns nas frações TOTAL e POLISSOMA após 24h de indução adipogênica.

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Biotype	logFC/TOTAL	logFC/POLI	FDR/TOTAL	FDR/POLI	Pvalue/TOTAL	Pvalue/POLI
ENSG00000224259	LINC01133	lincRNA	-1,199043	-1,377742124	1,14E-07	2,88E-10	4,86E-09	1,06E-11
ENSG00000248187	RP11-184M15.1	lincRNA	-1,241233	-1,417254511	3,29E-06	2,05E-10	1,81E-07	7,34E-12
ENSG00000233117	LINC00702	lincRNA	-1,735944	-2,302102305	0,005560656	1,45E-11	0,000762283	4,46E-13
ENSG00000172965	MIR4435-1HG	lincRNA	-1,780427	-1,993752657	1,24E-08	1,97E-16	4,65E-10	3,55E-18
ENSG00000269825	CTD-3099C6.9	sense_intronic	-2,13981	-2,266672232	0,000759659	6,10E-06	7,50E-05	4,56E-07
ENSG00000203706	SERTAD4-AS1	antisense	-2,605112	-2,172680021	0,000706786	4,42E-05	6,93E-05	3,99E-06
ENSG00000231290	APCDD1L-AS1	processed_transcript	-2,650182	-2,133839962	1,67E-07	2,69E-11	7,29E-09	8,60E-13
ENSG00000280206	CTB-193M12.5	TEC	-2,723786	-2,933933814	0,000300363	1,95E-05	2,64E-05	1,63E-06
ENSG00000279338	RP1-309I22.2	sense_overlap	-3,230295	-2,053941369	1,59E-22	0,00113715	1,24E-24	0,000152505
ENSG00000239332	LINC01119	lincRNA	-3,264290	-2,278719327	0,000993315	8,30E-06	0,00010242	6,40E-07
ENSG00000248698	LINC01085	lincRNA	-3,405104	-2,278719327	9,85E-06	8,30E-06	6,01E-07	6,40E-07
ENSG00000261760	RP11-1223D19.1	lincRNA	-3,619557	-3,54444315	1,89E-06	3,10E-13	9,99E-08	7,62E-15
ENSG00000230417	LINC00856	lincRNA	-3,783242	-3,316000555	0,000537573	8,09E-08	5,09E-05	4,38E-09
ENSG00000229563	LINC01204	lincRNA	-3,877845	-3,452106553	0,002182248	1,58E-09	0,000251776	6,50E-11
ENSG00000246763	RGM-B-AS1	antisense	-3,930677	-2,794201724	3,35E-09	0,006381421	1,15E-10	0,001118129
ENSG00000272327	RP11-1002K11.1	lincRNA	-4,34086	-2,962643524	1,30E-09	7,01E-09	4,19E-11	3,19E-10

APÊNDICE 12.1 – 18 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL somente na diferenciação osteogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000261386	CTD-2012K14.6	16	14744	2	lincRNA	7,870160628	2,50E-05	5,81E-07
ENSG00000249456	RP11-298J20.4	10	25738	1	sense_overlapping	7,282981595	0,000390332	1,27E-05
ENSG00000268894	PLCE1-AS1	10	7794	4	antisense	6,425326213	5,80E-31	5,06E-34
ENSG00000230838	AC093850.2	2	1381	1	lincRNA	5,103238291	1,11E-05	2,44E-07
ENSG00000259828	RP11-63E9.1	6	3995	1	lincRNA	4,814225316	0,005199726	0,000261583
ENSG00000266088	RP5-1028K7.2	17	9976	2	lincRNA	4,685389114	0,003399277	0,000154089
ENSG00000254987	RP11-563P16.1	11	219277	1	lincRNA	3,900949999	0,000197094	5,98E-06
ENSG00000235770	LINC00607	2	232159	6	lincRNA	3,725521086	1,16E-20	3,03E-23
ENSG00000237697	LINC00312	3	2093	1	lincRNA	3,656724337	6,89E-05	1,75E-06
ENSG00000241162	RN7SL617P	6	308	1	misc_RNA	3,461849015	8,51E-05	2,26E-06
ENSG00000278133	RP11-196G11.5	16	1829	2	sense_intronic	3,221912824	0,00198115	8,13E-05
ENSG00000248890	HHIP-AS1	4	18435	3	antisense	3,153069053	0,00803823	0,000442954
ENSG00000197301	RP11-366L20.2	12	30827	4	antisense	2,831675694	1,75E-06	3,05E-08
ENSG00000225135	RP11-361F15.2	6	2801	1	lincRNA	1,936280092	3,60E-05	8,47E-07
ENSG00000237187	NR2F1-AS1	5	176289	14	antisense	1,614584131	0,00081016	2,89E-05
ENSG00000232855	AF131217.1	21	235502	3	lincRNA	1,423619936	0,004351336	0,000208626
ENSG00000200312	RN7SKP255	14	308	1	misc_RNA	1,159536107	0,00156742	6,14E-05
ENSG00000200488	RN7SKP203	2	332	1	misc_RNA	1,13049782	0,003575124	0,000164287

APÊNDICE 12.2 – lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL somente na diferenciação osteogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000247311	CTC-441N14.2	5	26094	1	antisense	5,244961345	1,30E-07	1,85E-09
ENSG00000239828	RP11-446H18.5	3	109549	10	lincRNA	4,83652092	8,53E-05	2,55E-06
ENSG00000268894	PLCE1-AS1	10	7794	4	antisense	4,706738371	2,61E-12	1,51E-14
ENSG00000225511	LINC00475	9	18816	8	lincRNA	4,615256138	0,001271843	6,39E-05
ENSG00000267080	ASB16-AS1	17	10744	5	antisense	4,361185238	0,001756141	9,26E-05
ENSG00000237697	LINC00312	3	2093	1	lincRNA	4,213961419	6,92E-05	2,00E-06
ENSG00000272053	RP11-367G6.3	6	27218	1	lincRNA	4,201425093	0,004787819	0,000311405
ENSG00000276075	CTD-2012K14.8	16	10813	2	antisense	4,176754596	0,002126739	0,000116042
ENSG00000235770	LINC00607	2	232159	6	lincRNA	3,773802207	3,25E-19	7,38E-22
ENSG00000274627	RP11-104N10.2	16	5420	1	sense_intronic	3,653095684	0,008053756	0,000608742
ENSG00000254510	RP11-867G23.10	11	7979	3	processed_transcript	3,639001317	0,006279216	0,000439028
ENSG00000254987	RP11-563P16.1	11	219277	1	lincRNA	3,387656726	3,45E-08	4,23E-10
ENSG00000279204	RP11-175K6.2	5	2237	1	TEC	3,34309396	0,003481061	0,00021196
ENSG00000259450	RP11-265N7.1	15	5871	1	lincRNA	2,663565026	1,22E-05	2,84E-07
ENSG00000197301	RP11-366L20.2	12	30827	4	antisense	2,624186613	8,11E-08	1,11E-09
ENSG00000236671	PRKG1-AS1	10	83386	3	antisense	2,622236573	0,003704747	0,000228999
ENSG00000227145	IL21-AS1	4	70173	1	antisense	2,530996048	0,000557189	2,38E-05
ENSG00000268913	AC026806.2	19	442	1	lincRNA	2,495226595	0,007258211	0,000529479
ENSG00000245532	NEAT1	11	22766	5	lincRNA	2,413286716	8,35E-09	8,86E-11
ENSG00000260910	LINC00565	13	2330	1	lincRNA	2,37965217	0,000482226	1,99E-05
ENSG00000269990	CTD-3074O7.12	11	2038	1	lincRNA	2,244477619	0,003543016	0,000216667
ENSG00000254343	RP11-760H22.2	8	4021	2	lincRNA	2,013734809	0,003426946	0,00020731

ENSG000000248890	HHIP-AS1		4	18435	3	antisense		2,008756309	0,004765251	0,000309624
ENSG000000279118	RP11-517I3.2		5	2325	1	TEC		1,861680457	0,000181307	6,21E-06
ENSG000000280143	AP000892.6		11	5325	1	TEC		1,814842486	9,70E-05	3,00E-06
ENSG000000240859	AC093627.10		7	5868	4	lincRNA		1,733966217	0,000354009	1,37E-05
ENSG000000250056	LINC01018		5	6363	4	lincRNA		1,7111158496	0,002963662	0,00017284
ENSG000000272565	RP11-485G4.2		3	4451	1	lincRNA		1,6433330054	0,00056965	2,44E-05
ENSG000000242539	AC007620.3		3	2230	3	antisense		1,636763919	0,000152161	5,08E-06
ENSG000000272695	GAS6-AS2		13	2665	1	lincRNA		1,600998834	0,007996586	0,000602313
ENSG000000272933	RP11-47A8.5		10	1348	1	lincRNA		1,5533087201	0,005811988	0,000400615
ENSG000000175898	CTD-2369P2.2		19	1759	2	lincRNA		1,258539906	0,004028202	0,000251646
ENSG000000130600	H19		11	6307	13	processed_transcript		1,240548348	0,006993992	0,000500987
ENSG000000259758	CASC7		8	9345	1	lincRNA		1,240030166	0,009973557	0,000803142
ENSG000000229847	EMX2OS		10	71853	7	antisense		1,198913241	0,005642254	0,000383371

APÊNDICE 12.3 – 46 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL somente na diferenciação adipogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000230695	AC012462.1	2	739	1	antisense	7,947109228	3,10E-07	1,41E-08
ENSG00000224251	RP11-499O7.7	10	1892	2	antisense	7,190360647	0,000122916	9,88E-06
ENSG00000226604	PAPPA-AS2	9	2940	1	antisense	6,961863433	0,000497208	4,65E-05
ENSG00000254860	TMEM9B-AS1	11	12852	3	antisense	5,751607721	2,17E-06	1,15E-07
ENSG00000196972	LINC00087	X	3606	1	lincRNA	5,428399447	0,000260152	2,26E-05
ENSG00000234362	AC104654.2	2	2124	2	lincRNA	5,036223437	7,40E-11	1,98E-12
ENSG00000270640	RP11-373D23.2	2	295	1	sense_intronic	4,52364266	0,009556506	0,001456369
ENSG00000225937	PCA3	9	23133	1	antisense	4,114848102	0,002610373	0,000313327
ENSG00000278309	RP11-102K13.5	13	5962	1	lincRNA	3,892403814	0,002243574	0,000260129
ENSG00000266904	LINC00663	19	19057	7	lincRNA	3,652993241	0,000437463	4,03E-05
ENSG00000256006	AC084117.3	11	1122	1	sense_intronic	3,499332193	0,006753315	0,000963873
ENSG00000262601	CTC-786C10.1	16	14087	1	lincRNA	3,318747991	0,000455787	4,24E-05
ENSG00000249641	HOXC13-AS	12	4315	1	antisense	3,23103022	0,00021886	1,86E-05
ENSG00000254622	NAV2-AS4	11	9006	1	antisense	3,13807662	0,003211767	0,000396046
ENSG00000267882	RP4-569M23.5	20	2252	1	antisense	2,934562439	0,00021278	1,81E-05
ENSG00000272356	RP5-1112D6.8	6	4314	1	antisense	2,889565245	0,004000745	0,000514329
ENSG00000260630	SNAI3-AS1	16	23888	6	antisense	2,805041314	0,000460416	4,29E-05
ENSG00000257151	PWAR6	15	4617	1	lincRNA	2,769735199	0,000292297	2,56E-05
ENSG00000182165	TP53TG1	7	20290	7	lincRNA	2,596585999	0,002388938	0,000281107
ENSG00000272841	RP3-428L16.2	6	2024	1	antisense	2,532480671	4,31E-12	9,77E-14
ENSG00000245812	RP11-175K6.1	5	16995	3	lincRNA	2,500096094	0,009628664	0,001469625
ENSG00000263934	SNORD3A	17	698	3	lincRNA	2,161009187	0,004956418	0,000663196

ENSG000000244879	GABPB1-AS1	15	17243	6	antisense	2,092961103	3,39E-16	4,75E-18
ENSG000000223891	OSER1-AS1	20	15067	5	lincRNA	2,073812645	0,003263308	0,000404542
ENSG000000226950	DANCR	4	7947	5	processed_transcript	2,041513896	7,99E-09	2,86E-10
ENSG000000234608	MAPKAPK5-AS1	12	3138	7	lincRNA	1,972683303	1,66E-07	7,25E-09
ENSG000000203709	C1orf132	1	67632	4	lincRNA	1,960527791	0,003443116	0,000432478
ENSG000000237036	ZEB1-AS1	10	114169	9	antisense	1,900679986	0,001162501	0,000122914
ENSG000000270022	RNU12	22	663	1	lincRNA	1,899288355	0,000299962	2,63E-05
ENSG000000258096	RP11-474P2.2	12	2315	1	antisense	1,870813577	0,000938029	9,56E-05
ENSG000000250548	RP11-47122.2	14	14340	2	lincRNA	1,862764708	0,00937228	0,001422501
ENSG000000221949	LINC01465	12	1939	2	lincRNA	1,858219045	0,002168324	0,000250027
ENSG000000280339	RP11-736K20.4	11	3248	1	TEC	1,749805417	0,002060868	0,000236014
ENSG000000255471	RP11-736K20.5	11	32823	2	antisense	1,542734822	0,004920932	0,00065748
ENSG000000262074	SNORD3B-2	17	687	3	lincRNA	1,542043832	2,07E-07	9,11E-09
ENSG000000223764	RP11-54O7.3	1	4151	3	lincRNA	1,309463461	9,13E-05	7,10E-06
ENSG000000265802	RN7SL49P	13	297	1	misc_RNA	1,294355724	0,007006534	0,001009206
ENSG000000170846	AC093323.3	4	2596	3	lincRNA	1,275621896	0,002525531	0,000301487
ENSG000000224870	RP4-758J18.2	1	2524	8	processed_transcript	1,265179542	0,000210163	1,78E-05
ENSG000000265185	SNORD3B-1	17	582	3	lincRNA	1,248573808	0,0024203	0,000286385
ENSG000000230630	DNM3OS	1	8263	1	antisense	1,218992047	3,53E-08	1,39E-09
ENSG000000261069	SNORD116-20	15	1235	1	lincRNA	1,218428726	0,000375992	3,39E-05
ENSG000000269936	MIR145	5	2548	1	lincRNA	1,164408698	2,00E-05	1,31E-06
ENSG000000223745	RP4-717I23.3	1	83839	24	processed_transcript	1,143039974	0,00580295	0,000802349
ENSG000000212978	AC016747.3	2	3377	4	processed_transcript	1,098466876	0,003218946	0,000397565
ENSG000000262202	SNORD3D	17	636	1	lincRNA	1,089315157	0,000253716	2,20E-05

APÊNDICE 12.4 – 31 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL somente na diferenciação adipogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000253716	RP13-582O9.5	8	1529	6	antisense	7,530705153	2,70E-07	1,56E-08
ENSG00000234362	AC104654.2	2	2124	2	lincRNA	4,646466402	1,25E-18	1,78E-20
ENSG00000267280	TBX2-AS1	17	18099	6	antisense	4,23752777	0,00093431	0,000121977
ENSG00000261578	RP11-21L23.2	11	4191	1	sense_overlapping	4,108329289	0,000793215	0,000100528
ENSG00000214900	C14orf182	14	25808	17	lincRNA	4,020996702	2,85E-09	1,21E-10
ENSG00000266921	RP11-15A1.7	19	5940	2	antisense	3,851683314	0,001646872	0,000233316
ENSG00000230838	AC093850.2	2	1381	1	lincRNA	3,538565494	0,000158269	1,62E-05
ENSG00000241162	RN7SL617P	6	307	1	misc_RNA	3,098909598	1,50E-05	1,22E-06
ENSG00000259863	SH3RF3-AS1	2	1603	1	lincRNA	3,097397489	2,41E-06	1,67E-07
ENSG00000247095	MIR210HG	11	2797	4	lincRNA	2,971122156	0,007138046	0,00127942
ENSG00000255284	AP006621.5	11	6719	3	lincRNA	2,687673129	0,001779633	0,000254898
ENSG00000234779	RP11-62F24.2	9	710	1	antisense	2,661073412	5,25E-05	4,84E-06
ENSG00000244586	WNT5A-AS1	3	609	1	antisense	2,41993777	0,00051081	6,08E-05
ENSG00000267254	ZNF790-AS1	19	30597	4	antisense	2,306293369	0,002322346	0,000348204
ENSG00000247271	ZBED5-AS1	11	48543	3	antisense	2,293251778	0,00018394	1,91E-05
ENSG00000272841	RP3-428L16.2	6	2024	1	antisense	2,28002333	1,09E-14	2,31E-16
ENSG00000244879	GABPB1-AS1	15	17243	6	antisense	2,279768789	1,01E-12	2,68E-14
ENSG00000261069	SNORD116-20	15	1235	1	lincRNA	2,260101871	0,002451096	0,000369481
ENSG00000223478	RP11-545E17.3	9	8749	1	antisense	1,921926846	0,001232181	0,000166902
ENSG00000228630	HOTAIR	12	12648	5	antisense	1,914560232	0,008014335	0,001475717
ENSG00000267858	MZF1-AS1	19	15668	3	antisense	1,744419028	0,00058166	7,04E-05
ENSG00000237037	NDUFA6-AS1	22	46811	16	processed_transcript	1,713869561	0,0074247	0,001341753

ENSG000000223764	RP11-54O7.3	1	4151	3	lincRNA	1,667916745	3,93E-07	2,36E-08
ENSG000000233016	SNHG7	9	6818	4	antisense	1,502630843	5,98E-09	2,70E-10
ENSG000000271270	TMCC1-AS1	3	24704	4	antisense	1,497585315	0,000458376	5,34E-05
ENSG000000262202	SNORD3D	17	636	1	lincRNA	1,451212804	1,56E-05	1,28E-06
ENSG000000230630	DNM3OS	1	8263	1	antisense	1,274325776	1,66E-08	8,05E-10
ENSG000000235609	AF127936.7	21	63132	7	lincRNA	1,221525954	0,003196209	0,000497445
ENSG000000215256	DHRS4-AS1	14	50108	6	antisense	1,196687637	7,91E-05	7,53E-06
ENSG000000262074	SNORD3B-2	17	687	3	lincRNA	1,118423646	0,001207501	0,000163073
ENSG000000234608	MAPKAPK5-AS1	12	3138	7	lincRNA	1,067931012	1,20E-05	9,62E-07
ENSG000000224870	RP4-758J18.2	1	2524	8	processed_transcript	1,023897937	0,000339301	3,81E-05

APÊNDICE 12.5 – 11 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração TOTAL na diferenciação osteogênica e adipogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Biotype	logFC/Osteo	logFC/Adipo	FDR/Osteo	FDR/Adipo	Pvalue/Osteo	Pvalue/Adipo
ENSG00000224260	RP1-272L16.1	lincRNA	8,272741049	8,955363887	1,16E-06	5,68E-13	1,92E-08	1,16E-14
ENSG00000267480	RP11-703I16.1	antisense	7,087317477	7,77883512	0,004078121	1,54E-05	0,00019121	9,72E-07
ENSG00000249609	RP11-635L1.3	antisense	6,539222442	7,539462482	0,005825288	5,60E-05	0,000300695	4,05E-06
ENSG00000261578	RP11-21L23.2	sense_overlapping	5,021108546	5,203461411	0,009346207	0,000135188	0,00052376	1,09E-05
ENSG00000236882	LINC01554	lincRNA	4,841940705	4,776794279	0,000920966	0,000349944	3,35E-05	3,12E-05
ENSG00000254343	RP11-760H22.2	lincRNA	2,774443522	1,798177993	2,62E-06	0,007112558	4,76E-08	0,00102683
ENSG00000261324	RP11-174G6.5	sense_overlapping	2,387092236	2,879327015	0,002052793	3,74E-08	8,51E-05	1,49E-09
ENSG00000255043	NAV2-AS5	antisense	2,165662938	2,878817957	0,009629001	1,04E-06	0,000543805	5,20E-08
ENSG00000259330	INAFM2	antisense	1,8922220474	1,339595795	9,10E-06	0,001395051	1,92E-07	0,000151254
ENSG00000246430	LINC00968	lincRNA	1,543498144	2,285681326	0,002558984	1,15E-11	0,000111378	2,75E-13
ENSG00000245532	NEAT1	lincRNA	1,4233336804	1,361816191	9,22E-06	2,27E-06	1,95E-07	1,21E-07

APÊNDICE 12.6 – 14 lncRNAs diferencialmente expressos up-regulados na fração POLISSOMAL na diferenciação osteogênica e adipogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Biotype	logFC/Osteo	logFC/Adipo	FDR/Osteo	FDR/Adipo	Pvalue/Osteo	Pvalue/Adipo
ENSG00000224260	RP1- 272L16.1	lincRNA	5,614469324	5,951644544	1,81E-07	1,57E-13	2,60E-09	3,73E-15
ENSG00000266088	RP5- 1028K7.2	lincRNA	4,739692288	3,83623786	1,63E-06	0,00031534	3,06E-08	3,51E-05
ENSG00000267480	RP11- 703I16.1	antisense	4,156796015	3,725218469	0,000221785	0,000811676	7,88E-06	0,000103358
ENSG00000249641	HOXC13- AS	antisense	3,463383923	3,098619881	1,82E-05	4,48E-06	4,41E-07	3,27E-07
ENSG00000236882	LINC01554	lincRNA	3,384774282	3,635685843	3,00E-05	1,66E-06	7,73E-07	1,11E-07
ENSG00000280339	RP11- 736K20.4	TEC	3,222223406	2,80192607	9,50E-05	5,12E-05	2,90E-06	4,71E-06
ENSG00000255471	RP11- 736K20.5	antisense	2,855082052	2,755211097	0,000419611	4,23E-06	1,68E-05	3,07E-07
ENSG00000259330	INAFM2	antisense	2,405755155	1,311836989	2,73E-10	4,04E-06	2,08E-12	2,92E-07
ENSG00000228035	RP4- 663N10.1	antisense	2,324578117	2,172479825	0,006371343	0,001969208	0,000447568	0,000288785
ENSG00000245812	RP11- 175K6.1	lincRNA	2,196032315	1,577973203	0,001254708	0,007456883	6,27E-05	0,001349569
ENSG00000229729	RP11- 159G9.5	lincRNA	2,096907413	1,490290745	0,001754004	0,006384843	9,24E-05	0,001119156
ENSG00000182165	TP53TG1	lincRNA	1,921203775	1,944210954	0,007489598	0,000221143	0,000551787	2,35E-05
ENSG00000246430	LINC00968	lincRNA	1,553782118	1,892859691	0,007336453	1,66E-09	0,000536153	6,89E-11
ENSG00000226950	DANCR	processed_transcript	1,541200477	1,746807871	0,001387283	2,66E-09	7,05E-05	1,12E-10

APÊNDICE 13.1 – 10 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL somente na diferenciação osteogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000246859	STARD4-AS1	5	227500	2	antisense	-1,191144295	0,008197595	0,000453777
ENSG00000259498	RP11-244F12.3	15	3353	2	antisense	-1,433946596	0,001814894	7,33E-05
ENSG00000235531	RP11-383H13.1	8	290226	10	antisense	-1,66892332	6,54E-06	1,32E-07
ENSG00000279095	AC092066.1	19	2027	1	TEC	-1,989135334	7,76E-05	2,02E-06
ENSG00000249378	LINC01060	4	280315	6	lincRNA	-2,138566674	0,002576485	0,000112942
ENSG00000224743	TEX26-AS1	13	51913	17	antisense	-2,818050854	0,003503664	0,000159912
ENSG00000236255	AC009404.2	2	7721	3	lincRNA	-3,004647122	0,00024527	7,56E-06
ENSG00000223749	MIR503HG	X	3295	5	lincRNA	-3,070664928	1,04E-10	9,07E-13
ENSG00000273002	RP11-336K24.12	1	4187	1	antisense	-3,838110753	0,001585308	6,25E-05
ENSG00000250038	RP11-180C1.1	4	40585	2	lincRNA	-5,470831507	0,003710598	0,000171479

APÊNDICE 13.2 – 18 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL somente na diferenciação osteogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000263426	RN7SL471P	6	299	1	misc_RNA	-1,028715754	0,007876701	0,000589131
ENSG00000225470	JPX	X	126084	12	lincRNA	-1,103382229	0,009832306	0,000786652
ENSG00000255717	SNHG1	11	3926	25	processed_transcript	-1,1677708	0,007577614	0,000562195
ENSG00000251022	THAP9-AS1	4	7951	12	antisense	-1,390777606	0,004424006	0,000281912
ENSG00000261040	WFDC21P	17	8319	8	processed_transcript	-1,578598843	0,000914916	4,26E-05
ENSG00000269893	SNHG8	4	1114	5	lincRNA	-1,579488706	2,98E-05	7,66E-07
ENSG00000232774	FLJ22447	14	88156	3	lincRNA	-1,606799555	0,005477543	0,000370704
ENSG00000235531	RP11-383H13.1	8	290226	10	antisense	-1,628253116	5,80E-05	1,65E-06
ENSG00000224032	EPB41L4A-AS1	5	3750	4	lincRNA	-1,684035609	0,000206633	7,27E-06
ENSG00000177410	ZFAS1	20	17560	10	antisense	-1,69428576	2,81E-06	5,62E-08
ENSG00000234741	GAS5	1	4982	29	processed_transcript	-1,705463881	0,000127267	4,13E-06
ENSG00000261824	LINC00662	19	109360	9	lincRNA	-1,898582324	5,82E-05	1,66E-06
ENSG00000249378	LINC01060	4	280315	6	lincRNA	-1,963687166	0,004553438	0,00029256
ENSG00000230623	RP11-469A15.2	1	4373	4	lincRNA	-3,31213469	0,000882625	4,09E-05
ENSG00000236404	VLDLR-AS1	9	220657	5	antisense	-3,547758998	0,000643811	2,82E-05
ENSG00000235513	RP4-756G23.5	22	8505	2	antisense	-3,828457403	0,000380989	1,50E-05
ENSG00000223749	MIR503HG	X	3295	5	lincRNA	-4,055986996	0,000375011	1,47E-05
ENSG00000231196	RP11-495P10.8	1	4969	1	lincRNA	-6,104484143	1,79E-06	3,37E-08

APÊNDICE 13.3 – 12 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL somente na diferenciação adipogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000259758	CASC7	8	9345	1	lincRNA	-1,218038342	4,41E-05	3,12E-06
ENSG00000233117	LINC00702	10	42771	3	lincRNA	-1,735944891	0,005560656	0,000762283
ENSG00000172965	MIR4435-1HG	2	298750	2	lincRNA	-1,780427921	1,24E-08	4,65E-10
ENSG00000269825	CTD-3099C6.9	19	2847	1	sense_intronic	-2,13981584	0,000759659	7,50E-05
ENSG00000203706	SERTAD4-AS1	1	2591	3	antisense	-2,605112143	0,000706786	6,93E-05
ENSG00000280206	CTB-193M12.5	16	881	1	TEC	-2,723786952	0,000300363	2,64E-05
ENSG00000239332	LINC01119	2	42310	4	lincRNA	-3,264290918	0,000993315	0,00010242
ENSG00000248698	LINC01085	4	28084	4	lincRNA	-3,40510415	9,85E-06	6,01E-07
ENSG00000261760	RP11-1223D19.1	2	54750	5	lincRNA	-3,619557574	1,89E-06	9,99E-08
ENSG00000230417	LINC00856	10	436854	17	lincRNA	-3,78324208	0,000537573	5,09E-05
ENSG00000229563	LINC01204	X	124814	3	lincRNA	-3,877845089	0,002182248	0,000251776
ENSG00000246763	RGMB-AS1	5	3851	5	antisense	-3,930677423	3,35E-09	1,15E-10

APÊNDICE 13.4 – 37 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL somente na diferenciação adipogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Chrom.	Size	Transcripts	Biotype	logFC	FDR	PValue
ENSG00000260604	RP1-140K8.5	6	7059	1	lincRNA	-1,074095916	0,003393828	0,000536395
ENSG00000280123	RP11-267M23.1	8	2176	1	TEC	-1,145533634	0,005121274	0,000865737
ENSG00000223485	RP11-417E7.1	6	4832	3	lincRNA	-1,331320823	0,008289449	0,001532489
ENSG00000222041	LINC00152	2	151437	3	lincRNA	-1,491903526	1,39E-09	5,69E-11
ENSG00000261105	LMO7-AS1	13	31294	2	antisense	-1,542920484	0,004271745	0,000702648
ENSG00000261801	LOXL1-AS1	15	20177	13	antisense	-1,72056126	0,000118961	1,18E-05
ENSG00000261888	AC144831.1	17	2655	1	lincRNA	-1,756336808	0,00227249	0,000339053
ENSG00000234840	LINC01239	9	178013	2	lincRNA	-1,919795821	0,00550637	0,000940805
ENSG00000245146	LINC01024	5	35773	7	antisense	-1,939487163	0,00095796	0,000125647
ENSG00000172965	MIR4435-1HG	2	298750	2	lincRNA	-1,993752657	1,97E-16	3,55E-18
ENSG00000279338	RP1-309J22.2	22	28928	1	sense_overlapping	-2,053941369	0,00113715	0,000152505
ENSG00000231290	APCDD1L-AS1	20	104509	8	processed_transcript	-2,133839962	2,69E-11	8,60E-13
ENSG00000203706	SERTAD4-AS1	1	2591	3	antisense	-2,172680021	4,42E-05	3,99E-06
ENSG00000270069	MIR222HG	X	25063	2	lincRNA	-2,222493747	5,35E-08	2,79E-09
ENSG00000253658	RP11-600K15.1	8	192387	4	lincRNA	-2,225066902	8,99E-05	8,66E-06
ENSG00000231607	DLEU2	13	143168	8	antisense	-2,261792544	2,82E-05	2,44E-06
ENSG00000257167	TMPO-AS1	12	3449	2	antisense	-2,263799585	0,00024767	2,67E-05
ENSG00000269825	CTD-3099C6.9	19	2847	1	sense_intronic	-2,266672232	6,10E-06	4,56E-07
ENSG00000239332	LINC01119	2	42310	4	lincRNA	-2,278719327	8,30E-06	6,40E-07
ENSG00000226380	MIR29B1	7	36501	3	lincRNA	-2,301209422	0,002818463	0,00043204
ENSG00000233117	LINC00702	10	42771	3	lincRNA	-2,302102305	1,45E-11	4,46E-13
ENSG00000267325	LINC01415	18	4994	2	lincRNA	-2,308215852	4,19E-07	2,52E-08

ENSG000000246763	RGMB-AS1		5	3851	5	antisense		-2,794201724	0,006381421	0,001118129
ENSG000000248698	LINC01085		4	28084	4	lincRNA		-2,931921964	9,19E-14	2,13E-15
ENSG000000280206	CTB-193M12.5		16	881	1	TEC		-2,93393814	1,95E-05	1,63E-06
ENSG000000236255	AC009404.2		2	7721	3	lincRNA		-2,985463416	4,74E-07	2,87E-08
ENSG000000250056	LINC01018		5	6363	4	lincRNA		-3,060046509	0,000709034	8,88E-05
ENSG000000233521	RP5-1172A22.1		22	3378	2	lincRNA		-3,117578013	0,001194744	0,00016111
ENSG000000267577	CTD-2587H24.5		19	18601	1	antisense		-3,218376631	0,000776407	9,80E-05
ENSG000000241288	RP11-379B18.5		3	61837	22	processed_transcript		-3,255478242	0,000984443	0,000129384
ENSG000000230417	LINC00856		10	436854	17	lincRNA		-3,316000555	8,09E-08	4,38E-09
ENSG000000250303	RP11-356J5.12		11	91785	5	lincRNA		-3,338218711	1,51E-05	1,23E-06
ENSG000000223811	RP11-437J19.1		6	10941	1	lincRNA		-3,413961478	0,000111815	1,10E-05
ENSG000000229563	LINC01204	X		124814	3	lincRNA		-3,452106553	1,58E-09	6,50E-11
	RP11-									
ENSG000000261760	1223D19.1		2	54750	5	lincRNA		-3,54444315	3,10E-13	7,62E-15
ENSG000000248869	RP11-138J17.1		4	416077	2	lincRNA		-3,90458642	2,82E-07	1,63E-08
ENSG000000253161	RP11-150O12.1		8	132842	4	lincRNA		-5,832715224	1,16E-09	4,64E-11

APÊNDICE 13.5 – 7 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração TOTAL na diferenciação osteogênica e adipogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Biotype	logFC/Osteo	logFC/Adipo	FDR/Osteo	FDR/Adipo	Pvalue/Osteo	Pvalue/Adipo
ENSG000000279338	RP1-309I22.2	sense_overlapping	- 1,256729372	- 3,230295772	0,000189099	1,59E-22	5,71E-06	1,24E-24
ENSG000000248187	RP11-184M15.1	lincRNA	- 1,310858524	- 1,241233015	0,002675239	3,29E-06	0,000118104	1,81E-07
ENSG000000231290	APCDD1L-AS1	processed_transcript	- 1,810012104	- 2,650182681	0,000488873	1,67E-07	1,63E-05	7,29E-09
ENSG000000224259	LINC01133	lincRNA	- 2,026413887	- 3,264290918	4,93E-12	0,000993315	3,44E-14	0,00010242
ENSG000000272327	RP11-1002K11.1	lincRNA	- 3,616185785	- -4,34086442	9,04E-09	1,30E-09	1,03E-10	4,19E-11
ENSG000000226876	RP11-36N20.1	antisense	- 4,119715493	- 3,606694081	0,002383355	0,009726046	0,000102101	0,001486402
ENSG000000250064	RP11-123O22.1	lincRNA	- 4,967432031	- -5,94676816	6,17E-06	3,81E-08	1,23E-07	1,52E-09

APÊNDICE 13.6 – 6 lncRNAs diferencialmente expressos down-regulados na fração POLISSOMAL na diferenciação osteogênica e adipogênica (24h).

Ensembl_gene_id	Gene.ID	Biotype	logFC/Osteo	logFC/Adipo	FDR/Osteo	FDR/Adipo	Pvalue/Osteo	Pvalue/Adipo
ENSG00000248187	RP11-184M15.1	lincRNA	-1,510095919	-1,417254511	0,000945641	2,05E-10	4,44E-05	7,34E-12
ENSG00000224259	LINC01133	lincRNA	-2,365604664	-1,377742124	4,10E-11	2,88E-10	2,81E-13	1,06E-11
ENSG00000272975	MYHAS	antisense	-2,410017791	-3,861259734	0,006048143	2,10E-06	0,000421676	1,43E-07
ENSG00000272327	RP11-1002K11.1	lincRNA	-2,618685645	-2,962643524	0,000105657	7,01E-09	3,32E-06	3,19E-10
ENSG00000272341	RP1-151F17.2	lincRNA	-3,891396592	-2,563655137	0,001820137	0,0033292	9,70E-05	0,000521492
ENSG00000250038	RP11-180C1.1	lincRNA	-8,186442541	-5,963250704	6,90E-18	6,25E-18	2,04E-20	9,69E-20

APÊNDICE 14 – Fragmentos de proteínas reconhecidos na peptidômica por espectrometria de massas

